

Tout grand progrès scientifique est né d'une nouvelle audace de l'imagination.

*John
Dewey*

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Pr Michel Pinget de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, le Centre Européen d'Etude du Diabète durant ces 6 années. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et de m'avoir offert l'opportunité d'occuper un second poste à temps partiel qui m'a sortie d'une mauvaise passe.

Ensuite je souhaiterais évidemment remercier le Dr Séverine Sigrist pour tout ce que nous avons partagé pendant toutes ces années alors même que je suis arrivée du haut de mes 21 ans. C'est en grande partie grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. Merci également pour ton accompagnement tout au long de ce travail de thèse ainsi que nos échanges parfois toniques et malgré ton départ du CEED nous y sommes arrivés. Pour finir je te remercie surtout pour tes valeurs humaines qui sont aujourd'hui assez rares, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi, tu restes un modèle de carrière pour moi et j'espère pouvoir suivre tes traces.

Je remercie également le Pr Eric Marchioni, co-directeur de cette thèse pour son encadrement à distance, son expertise avec ses bonnes idées même quand on ne s'y attend pas et sa bonne humeur à toute épreuve.

Un merci tout particulier au Dr Elisa Maillard-Pedracini pour ces 6 années de travail avec toi. Mon aventure au CEED a commencé avec toi et se termine en quelque sorte avec toi aussi. J'ai énormément apprécié tous nos échanges professionnels comme personnels. Tu m'as transmis la passion de la recherche et tu es pour moi un manager hors-pair. Je te souhaite une très belle suite de carrière même si je n'en doute pas.

Je remercie vivement les membres du jury, le Dr Vauthier Christine, directeur de recherche, UMR CNRS 8612 Institut Gallien de l'Université Paris-Sud, Le Pr Jamileh Movassat, Responsable de l'équipe recherche, UMR8251 Biologie et pathologie du pancréas endocrine, à l'Université Paris Diderot, le Pr Igor Clarot (professeur à CITHEFOR EA3452, à la faculté de pharmacie de Nancy) et le Dr Emmanuel Andres Professeur de Médecine Interne et Chef de

Service du Service de Médecine Interne, Diabète et Maladies métaboliques aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci au Dr Karim Bouzakri de m'avoir donné l'opportunité de découvrir un congrès comme l'IDF à Abu Dhabi, nos ascensions à la mosquée en tchador ou dans le désert avec les chameaux, ce voyage restera mémorable pour moi.

Merci au Dr Yves Frère pour ses précieux conseils pendant toutes ces années, c'est grâce à vous que m'est venu cet attrait pour l'encapsulation. Nos échanges n'ont jamais trouvé remplaçant. Je vous souhaite une bonne retraite.

Merci au Dr Martine Bergaentzlé pour son aide sur la publication validation de méthode je partais de loin donc un énorme merci.

Merci aussi au Dr Diane Julien David pour ton aide sur ma chaîne HPLC et surtout pour ta joie de vivre, ton sourire et nos échanges plus perso, tu es top☺.

Un grand merci à Romain et pas uniquement pour les nombreuses fois où tu m'as aidé que ce soit tout au long de cette thèse ou pour la rédaction de ce manuscrit mais aussi pour ce que tu es, toi et tes valeurs. C'est tellement agréable de travailler avec toi (de boire des bières à Amsterdam aussi☺). Tu es vraiment super comme collègue.

Merci au Dr Stéphanie Dal pour sa sympathie et les coups de pouce sur le projet NanoEG à mes débuts ainsi qu'au Dr Alan Langlois pour ton aide pendant les suivis ORAIL.

Merci à Maria pour sa sympathie, j'ai appris à te connaître et tu es vraiment cool comme fille je te souhaite de belles années au CEED.

Merci à William pour nos gavages à 7 heures du matin durant les merveilleux suivis et nos échanges pendant les réunions ORAIL.

Merci à Cynthia pour ces années passées avec toi et nos soirées pas toujours très catholiques☺.

Ensuite comment oublier mon Claudio, nos repas du midi ensemble, le sport à 8h du matin (quand j'étais motivée), le tennis, les footings, le bricolage de mon appart quand j'en avais besoin je pense que l'on peut dire qu'on a tout fait ensemble pendant toutes ces années. Tu as toujours été là pour moi, tu es une personne exceptionnelle et j'espère vraiment qu'on restera toujours en contact et que je ne ferai pas partie des thésards dont tu ne connais plus le nom comme on en a fait si souvent la liste ☺ Ne m'oublie pas.

Un paragraphe évidemment pour Carole même si un livre ne suffirait pas à te remercier☺. Nous sommes arrivées ensemble et je me rappelle encore nos 6 premiers mois sans se parler et grâce à nos multiples addictions on en est là aujourd'hui. On a tellement partagé de choses ensemble, je ne pense pas un jour retrouver une collègue comme toi, bien plus qu'une collègue d'ailleurs, une amie. Nos soirées si exceptionnelles et qui font tellement de bien vont me manquer même si j'espère que peu importe l'endroit où je serai dans le monde tu viendras me rendre visite. Merci pour tout tout tout...

Un énorme énorme énorme merci à ma Harzo d'amour, ma copine de toujours, tu es la personne la plus géniale que je connaisse, j'espère vraiment que tu seras heureuse dans les années à venir car tu le mérites tellement. Sache en tout cas que je serai toujours là pour toi-même à distance, je ne te laisserai jamais tomber. En attendant je sais que Claudio est là pour s'occuper de toi aussi. Nos longues discussions vont tellement me manquer... je viendrai te voir promis.

Ensuite comment oublier la team thésards avec d'abord mes deux acolytes Ju et Flo. Je ne pensais jamais dire ça (surtout Ju ☺) mais vous allez vraiment me manquer, un bureau sans vous ce ne sera vraiment pas la même chose. Toujours là pour mettre la bonne humeur et le sourire, je vous adore et j'espère vraiment qu'on se recroisera pour que je vous traumatise encore un peu...Restez comme vous êtes et bon courage pour votre dernière année de thèse ! N'oubliez surtout pas de m'inviter !!!

Merci aussi à Laura pour sa gentillesse, ses bons gâteaux, toujours serviable, je te souhaite bon courage à Lyon et j'espère que ce sera une bonne opportunité pro pour toi 😊

La team thésard et bien sûr l'ancienne team thésard ma Nanaïs d'amour qui est loin de nous maintenant, tu nous manques terriblement, ce n'est vraiment plus pareil depuis que tu es partie 😊 on ne s'oublie pas même si je quitte le pays comme tu l'as fait on aura toujours l'occasion de se retrouver les 3. Je te kiffe tellement 😊

Mais aussi mon Doudou, je suis tellement contente qu'on garde contact comme on le fait régulièrement, quelqu'un comme toi à vraiment manqué au CEED ces dernières années.

Ensuite évidemment ma petite Aurélie. Une bonne grosse année passée ensemble c'était top tu es volontaire, bosseuse, agréable, reconnaissante je pense que je ne pouvais pas rêver mieux comme personne à encadrer. Je ne me fais aucun souci pour toi après mon départ ni après ce master et je serai évidemment là si tu as besoin de quoi ce soit, que ce soit pendant l'année à venir ou pour de l'aide dans ta future carrière donc n'hésite pas. Je te recommanderai les yeux fermés aussi bien dans ton travail qu'en ta personne.

Merci à Guillaume et Ophélie nos deux apprentis et non pas stagiaire, discrets et toujours agréables, un plaisir de travailler avec vous ! Je vous souhaite une belle continuation et un futur job au top ;))

Je descends ensuite d'un étage pour remercier ma Carine et les millions de fois où tu m'as sorti d'une galère. Tu es tellement disponible, gentille et patiente je pense que tout serait beaucoup plus facile si tout le monde était comme toi. J'ai tellement apprécié toutes nos discussions aussi bien tôt le matin que plus tard le soir. A bientôt je l'espère.

Ensuite ma petite Claire, j'ai appris à te connaître ces dernières années et tu es toppissime. Toujours souriante aussi bien au CEED qu'en dehors, j'espère qu'on aura encore l'occasion de boire des bières ensemble ou d'écouter de la musique pour décompresser quand on en a besoin. Je ferai en sorte que oui 😊

Je voudrais également remercier Mr Seyller de m'avoir sortie de quelques galères et pour sa disponibilité à toute épreuve. Merci pour nos échanges scientifiques également 😊. Merci à Estelle, qui a changé de poste durant ces années, agréable comme toujours, un plaisir de travailler avec toi. Egalement Fotini tu es arrivée plus récemment mais tu as une joie de vivre, tu te prends pas la tête j'adore !

Merci à la team Defymed, Aladin, Aram et Jordan, la plus masculine qui soit mais toujours drôle et sympa, c'est toujours un plaisir d'échanger avec vous. Merci aussi à Richard que je croise parfois 😊.

Je remercie également vivement les stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler c'est-à-dire Romain, Aline et Doryane, tous les trois volontaires vous m'avez beaucoup aidé et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Enfin je voudrais remercier nos nombreux autres stagiaires, j'en ai vu passé en 6 années. Anne notre future maman et une des stagiaires les plus cool de la terre, Charlène, Pauline, Charlotte, Asma, Mustapha et bien d'autres qui sont passés par chez nous et qui font vivre chaque année le labo pendant 6 mois.

Plus personnellement, un merci inconditionnel à ma famille, ma maman chérie qui m'a toujours soutenue durant toutes ces années et toujours fière de moi, cette fierté n'a pas d'égal. Merci à mon père, moins expressif mais fier également, tu n'as pas besoin d'en faire plus pour que je le sache. Un merci également à mon Frère d'avoir été là et à la personne la plus importante dans ma vie, ma sœur. Je vous aime tous.

Merci à mes amis (Strasbourgeois ou non) pour votre soutien et pour m'avoir changé les idées quand il le fallait. Un merci tout particulier à Jéjé, ami comme jamais, je suis tellement reconnaissante du soutien que tu m'as apporté pendant ces trois années.

Et évidemment, merci à ma Camille, la plus formidable des amies, tu as toujours été à 100 % derrière moi, à me motiver quand j'avais des doutes, à me soutenir dans les épreuves de la vie. Je ne sais vraiment pas ce que j'aurais fait sans toi.

Enfin merci à Jonathan qui m'a soutenue durant une partie de ce travail et surtout qui est présent pour son aboutissement.

SOMMAIRE

Liste des Figures.....	I
Liste des tableaux.....	IV
Liste des abréviations.....	V
1 Introduction générale.....	1
2 Etat de l'art	3
2.1 L'adhésion thérapeutique	3
2.1.1 Quelques chiffres	3
2.1.2 Définitions	3
2.1.2.1 Compliance/observance	3
2.1.2.2 Adhésion thérapeutique	4
2.1.2.3 Concordance	5
2.1.3 Facteurs et raisons influençant la non adhésion	5
2.1.3.1 L'oubli.....	6
2.1.3.2 Le manque d'informations données aux patients	6
2.1.3.3 Douleur et impact social	6
2.1.3.4 Deux cas particuliers	7
2.1.3.4.1 L'adhésion dans les maladies chroniques	7
2.1.3.4.2 L'adhésion en clinique	7
2.1.4 Mesure de l'adhésion.....	7
2.1.4.1 Directe.....	7
2.1.4.2 Indirecte	8
2.1.5 Stratégies pour augmenter l'adhésion.....	8
2.1.5.1 L'éducation thérapeutique du patient (ETP)	9
2.1.5.2 La relation patient-médecin.....	9
2.2 Les bio-médicaments et leur voie d'administration	11
2.2.1 Les bio-médicaments	11
2.2.2 La Voie d'administration des bio-médicaments : la voie parentérale	12
2.2.3 La voie orale, une voie d'administration stratégique	14
2.2.4 Physiologie de la voie orale.....	15
2.2.4.1 Le tractus gastro-intestinal (GI)	15
2.2.4.2 Physiologie de l'estomac.....	15
2.2.5 Physiologie de l'intestin	16
2.2.6 L'épithélium intestinal.....	18

2.2.6.1	Composition cellulaire	18
2.2.6.1.1	Le mucus intestinal	21
2.2.7	Transport des molécules à travers l'épithélium intestinal.....	23
2.2.8	Transport paracellulaire	24
2.2.9	Transport transcellulaire par les entérocytes	24
2.3	Les barrières de la voie orale pour l'administration de bio-médicaments.....	26
2.3.1	Physiques.....	26
2.3.2	Chimiques.....	26
2.3.3	Biologiques	26
2.4	Les bio-médicaments d'intérêts pour la voie orale	27
2.4.1	L'insuline par voie orale	27
2.4.1.1	Pourquoi ?	27
2.4.1.2	Le marché de l'insuline	27
2.4.1.3	La molécule d'insuline.....	28
2.4.1.4	Le rôle de l'insuline	30
2.4.1.5	Dans le foie.....	32
2.4.1.6	Dans les muscles et le myocarde	32
2.4.1.7	Dans le tissu adipeux.....	32
2.4.1.8	Le diabète.....	33
2.4.1.8.1	Définition et chiffres	33
2.4.1.8.2	Le diabète gestationnel	34
2.4.1.8.3	Le diabète de type 1	34
2.4.1.8.4	Le diabète de type 2	35
2.4.1.9	L'insulinothérapie	36
2.4.1.9.1	Sécrétion physiologique et niveau d'insuline.....	36
2.4.1.9.2	L'apport d'insuline exogène	36
2.4.1.9.2.1	Les différents types d'insuline.....	36
2.4.1.9.2.2	Les modes d'administration de l'insuline	40
2.4.2	L'héparine par voie orale	43
2.4.2.1	Pourquoi ?	43
2.4.2.2	Le marché de l'héparine	43
2.4.2.3	La maladie thromboembolique veineuse	43
2.4.2.3.1	Définition et chiffres	43
2.4.2.3.2	Physiopathologie de la thrombose veineuse profonde	44
2.4.2.3.3	Complications de la TVP	45

2.4.2.3.4	Les traitements anticoagulants	45
2.4.2.3.4.1	Les anti-vitamines K.....	45
2.4.2.3.4.2	Les nouveaux anticoagulants oraux (NAO)	47
2.4.2.3.4.3	L'héparine	47
2.5	Stratégies pour pallier aux différentes barrières de la voie orale	53
2.5.1	Modifications chimiques des molécules	53
2.5.2	Amplificateurs d'absorption.....	54
2.5.3	Muco-adhésion.....	55
2.5.4	Les systèmes d'encapsulation	55
2.5.4.1	Les microparticules	55
2.5.4.2	Les liposomes	56
2.5.4.3	Les micelles	57
2.5.4.4	Les nanoparticules	58
2.5.4.4.1	Nanoparticules lipidiques	59
2.5.4.4.2	Nanoparticules polymériques	59
2.5.4.4.2.1	Techniques de préparation des NPs polymériques.....	61
2.6	Le brevet concept de la double encapsulation	65
2.7	Données antérieures du projet	67
2.7.1	Le véhicule gastro-résistant	67
2.7.2	Le système nanoparticulaire	70
3	Objectifs.....	73
4	Matériel et méthode	75
4.1	Insuline et héparine : formulation des NPs et validation <i>in vitro/in vivo</i>	75
4.1.1	Formulation et caractérisation des NPs d'insuline et d'héparine.....	75
4.1.1.1	Préparation des nanoparticules de PLGA	75
4.1.1.2	Recouvrement acide hyaluronique/Polyéthylène glycol 200.....	76
4.1.1.3	Lyophilisation des NPs	76
4.1.1.4	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules.....	77
4.1.1.5	Détermination de l'efficacité d'encapsulation	79
4.1.1.5.1	Quantification de l'insuline par méthode HPLC	80
4.1.1.5.2	Quantification de l'héparine par méthode UV-visible	80
4.1.1.6	Microscopie électronique à balayage (MEB)	80
4.1.1.7	Tests de stabilité des nanoparticules dans le temps	81
4.1.1.8	Test de stabilité des NPs en milieux simulés	81
4.1.2	Validation <i>in vitro</i>	81

4.1.2.1	Modèles <i>in vitro</i> et culture cellulaire	81
4.1.2.2	Toxicité des nanoparticules	82
4.1.2.3	Mesures de la résistance électrique trans-épithéliales	82
4.1.2.4	Etude du passage intestinal des nanoparticules par cytométrie en flux....	83
4.1.2.4.1	Filtration des NPs contenant un principe actif couplé FITC	83
4.1.2.4.2	Quantification du passage intestinal	83
4.1.3	Le vecteur gastro-résistant.....	85
4.1.3.1	Formulation du vecteur gastro-résistant d'alginate	85
4.1.3.2	Validation du vecteur gastro-résistant	86
4.1.4	Validation <i>ex-vivo</i> des NPs d'héparine	86
4.1.5	Validation <i>in vivo</i> des NPs d'insuline	87
4.1.5.1	Modèle animal	87
4.1.5.2	Validation des NPs par injections SC/IP	87
4.1.5.3	Validation du vecteur complet avec l'insuline par voie orale	88
4.1.6	Analyses statistiques	89
4.2	Validation de la méthode de quantification de l'insuline par HPLC	89
4.2.1	Préparation des solutions	89
4.2.2	Quantification de l'insuline par HPLC-DAD	89
4.2.3	Validation de méthode.....	90
4.2.3.1	Sélectivité.....	90
4.2.3.2	Sensibilité et linéarité	91
4.2.3.3	Fidélité.....	92
4.2.3.4	Justesse	92
5	Résultats	94
5.1	Validation de la méthode de quantification de l'insuline par HPLC	94
5.1.1	Contexte de l'étude.....	94
5.1.2	Modification de la concentration en sulfate de sodium de la phase mobile	95
5.1.3	Validation de méthode.....	96
5.1.3.1	Linéarité et sensibilité	96
5.1.3.2	Justesse et sélectivité.....	97
5.1.3.3	Fidélité.....	99
5.1.4	Discussion	99
5.2	Impact de la charge de surface des NPs d'insuline	101
5.2.1	Contexte de l'étude.....	101
5.2.2	Caractérisation physico-chimique des NPs	102

5.2.3	Stabilité des NPs dans le temps	104
5.2.4	Stabilité des NPs en milieux simulés	104
5.2.5	Toxicité <i>in vitro</i> des NPs	106
5.2.6	Effet <i>in vitro</i> des NPs sur les jonctions serrées	107
5.2.7	Absorption intestinale des NPs <i>in vitro</i>	108
5.2.8	Caractérisation des véhicules gastro-résistants.....	109
5.2.9	Validation <i>in vivo</i> des nanoparticules	110
5.2.10	Discussion.....	112
5.3	Impact de la libération d'insuline en conditions intestinales	117
5.3.1	Contexte de l'étude.....	117
5.3.2	Première stratégie : impact du type et de la quantité de polymère (PLGA)	118
5.3.2.1	Caractérisation physico-chimique des NPs.....	118
5.3.2.2	Stabilité des NPs en milieu intestinal.....	119
5.3.3	Seconde stratégie : impact du tensio-actif	120
5.3.3.1	Caractérisation physico-chimique des NPs.....	120
5.3.3.2	Stabilité des NPs en milieu intestinal.....	121
5.3.4	Troisième stratégie : impact du recouvrement des NPs.....	122
5.3.4.1	Caractérisation physico-chimique des NPs +PVA recouvertes.....	122
5.3.4.2	Stabilité des NPs en milieu intestinal.....	122
5.3.4.3	Etude des NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique	123
5.3.4.3.1	Caractérisation physico-chimique des NPs	123
5.3.4.3.2	Stabilité des NPs en milieu intestinal	124
5.3.4.3.3	Absorption intestinale <i>in vitro</i> des NPs	125
5.3.4.3.4	Validation <i>in vivo</i> des NPs.....	126
5.3.5	Discussion.....	127
5.4	Transposition du système nanoparticulaire à l'héparine	133
5.4.1	Contexte de l'étude.....	133
5.4.2	Caractérisation physico-chimique des NPs	133
5.4.3	Stabilité des NPs dans le temps	134
5.4.4	Stabilité des NPs en milieux simulés	135
5.4.4.1	Toxicité <i>in vitro</i> des NPs	136
5.4.4.2	Effet <i>in vitro</i> des NPs sur les jonctions serrées.....	137
5.4.4.3	Absorption intestinale des NPs <i>in vitro</i>	138
5.4.4.4	Etude <i>ex-vivo</i> : relargage d'héparine dans le sang	139
5.4.5	Discussion.....	140

6	Conclusion scientifique et perspectives	147
6.1	Conclusion scientifique	147
6.2	Perspectives	148
7	Conclusion générale	150
8	Bibliographie.....	152
9	Publications	166
10	Communications orales	167
11	Communications affichées	168
12	Annexes	169

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dimensions de l'observance selon l'OMS	6
Figure 2 : Les étapes pour augmenter l'adhésion thérapeutique.....	8
Figure 3 : Nombre de bio-médicaments commercialisés en France par année	11
Figure 4 : Domaines pharmacologiques des bio-médicaments commercialisés en France en 2013 (en %).....	12
Figure 5 : Les étapes de l'absorption orale d'un principe actif dans un comprimé gastro-résistant	15
Figure 6 : Composition et caractéristiques du tractus gastro-intestinal.....	17
Figure 7 : Structure de l'épithélium intestinal	18
Figure 8 : Structure et composition cellulaire de l'épithélium intestinal	19
Figure 9 : Représentation des jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal	20
Figure 10 : Structure d'une jonction serrée	21
Figure 11 : Schéma de l'épaisseur des couches de mucus dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal chez le rat.....	23
Figure 12 : Mécanismes de transport des molécules à travers l'épithélium intestinal	24
Figure 13 : Mécanisme d'internalisation des molécules à travers l'épithélium intestinal	25
Figure 14 : Structure primaire et configuration spatiale de la molécule d'insuline	28
Figure 15 : Schéma de la production d'insuline dans la cellule β	29
Figure 16 : Mécanisme d'exocytose de l'insuline par la cellule β	30
Figure 17 : Récepteur de l'insuline.....	31
Figure 18 : Mécanisme d'entrée du glucose par le transporteur GLUT-4	32
Figure 19 : Chiffres du diabète dans le monde en 2015 et 2040 (20-79ans).....	33
Figure 20 : Exemple d'un schéma de thérapie insulinaire	37
Figure 21 : Modifications chimiques de l'insuline pour obtenir des analogues à vitesse d'action variable.....	37
Figure 22 : Stylos à insuline à cartouche ou jetable.....	40
Figure 23 : Pompe à insuline portable	41
Figure 24 : Pompe à insuline implantable.....	41
Figure 25: Système MiniMed® 670G.....	42
Figure 26: Impact de l'âge sur l'apparition de la MVTE	44
Figure 27 : Cycle de la vitamine K.....	46
Figure 28 : Structure chimique de l'héparine, exemple d'une unité d'acide uronique et de glucosamine et d'un groupement pentasaccharidique	48
Figure 29 : Sites de fixation de l'héparine à l'antithrombine.....	49
Figure 30 : Mécanisme de fixation de l'héparine à l'antithrombine	49
Figure 31 : Mécanisme d'action et activité anti IIa/anti Xa de l'héparine (PS=polysaccharide) selon sa longueur de chaîne.....	51
Figure 32 : Méthodes de préparation des différentes héparines.....	52
Figure 33 : Poids moléculaire et rapport anti-Xa/anti IIa des différentes héparines	52
Figure 33 : Greffage du PEG sur le groupement lysine de l'insuline.....	53
Figure 34 : Structure des microcapsules vs microsphères.....	56
Figure 35 : Structure d'un liposome.....	57
Figure 36 : Structure d'une micelle	58
Figure 37 : Comparaison de la structure d'une nanosphère à celle d'une nanocapsule.....	58

Figure 38 : Structure chimique de polymères synthétiques utilisés dans la formulation de nanoparticules.....	60
Figure 39 : Structure chimique de polymères d'origine naturelle utilisés dans la formulation de nanoparticules.....	60
Figure 40 : Structure chimique de PLGA	64
Figure 41 : Concept de la double encapsulation	66
Figure 42 : Cinétique de libération de la caféine contenue dans des gélules PCcaps®	68
Figure 43 : Concentration de paracétamol dosée dans le plasma de rat	68
Figure 44 : Etude de stabilité des véhicules renfermant des nanoparticules.....	69
Figure 45 : Internalisation des nanoparticules selon la charge de surface sur un modèle cellulaire Caco-2.	71
Figure 46 : Protocole de formulation des nanoparticules	75
Figure 47 : Principe de la granulométrie laser	77
Figure 48 : Profil de la mesure de taille par granulométrie laser	78
Figure 49 : Principe de la mesure de la charge de surface par granulométrie laser	79
Figure 50 : Protocole de détermination de l'efficacité d'encapsulation de l'insuline ou de l'héparine	80
Figure 51 : Modèles <i>in vitro</i> utilisés	82
Figure 52 : Protocole de mesure de la TEER	83
Figure 53 : Structure de l'insuline-FITC (A) et de l'héparine-FITC (B)	84
Figure 54 : Protocole de quantification de l'internalisation des NPs par cytométrie en flux..	85
Figure 55 : Protocole de formulation des véhicules gastro-résistants à base d'alginate par gélation ionotropique.....	86
Figure 56 : Protocole de validation du système de double encapsulation <i>in vivo</i>	88
Figure 57 : HPLC-DAD pour la quantification d'insuline	90
Figure 58 : Aspect du pic de l'insuline humaine.....	96
Figure 59 : Morphologie des NPs par microscopie électronique à balayage (MEB).....	102
Figure 60 : Stabilité des paramètres physico-chimiques dans le temps.....	104
Figure 61 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieux simulés	105
Figure 62 : Morphologie des différents types de NPs par microscopie électronique à balayage (MEB) en milieux gastrique et intestinal simulés.....	106
Figure 63 : Pourcentage de viabilité cellulaire	107
Figure 64 : Pourcentage de diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) des cellules comparé à la valeur initiale	108
Figure 65 : Quantification de la fluorescence associée aux cellules.....	109
Figure 66 : Morphologie des véhicules gastro-résistants d'alginate par microscopie électronique à balayage (MEB)	110
Figure 67 : Evolution de la glycémie des rats diabétiques	111
Figure 68 : Evolution de l'insulinémie des rats diabétiques	112
Figure 69 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal	120
Figure 70 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal	121
Figure 71 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal	123
Figure 72 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal	124
Figure 73 : Quantification de la fluorescence associée aux cellules.....	125
Figure 74 : Glycémie des rats diabétiques dans le temps.....	126
Figure 75 : Insulinémie des rats diabétiques dans le temps	127
Figure 76 : Stabilité des paramètres physico-chimiques des NPs d'héparine dans le temps	135

Figure 77 : Pourcentage d'héparine libérée des NPs en milieux simulés	136
Figure 78 : Pourcentage de viabilité cellulaire	137
Figure 79 : Pourcentage de diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) cellulaire	138
Figure 80 : Quantification de la fluorescence associée aux cellules	139
Figure 81 : Concentration d'héparine dans le sang des rats.....	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Stratégies pour augmenter l'adhésion thérapeutique.....	10
Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'insuline administrés	39
Tableau 3 : Résolution et facteur d'asymétrie	95
Tableau 4 : Validation de la méthode en termes de linéarité	97
Tableau 5 : Données de validation de méthode en termes de justesse.....	98
Tableau 6 : Valeurs des Biais (%).....	98
Tableau 7 : Données de validation de méthode en termes de fidélité.....	99
Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques des différents types de nanoparticules	103
Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques des nanoparticules.....	119
Tableau 10 : Paramètres physico-chimiques des NPs.....	121
Tableau 11 : Paramètres physico-chimiques des NPs.....	122
Tableau 12 : Paramètres physico-chimiques des différents types de nanoparticules	124
Tableau 13 : Paramètres physico-chimiques des différents types de nanoparticules	134

LISTE DES ABBREVIATIONS

Å : Ångström	LOD : Limite de détection
Da : Daltons	LOQ : Limite de quantification
AVK : Antivitamines K	MVTE : Maladie veineuse thromboembolique
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	MEB : Microscopie électronique à balayage
DT1 : Diabète de type 1	NPs : Nanoparticules
DT2 : Diabète de type 2	NAO : Nouveaux anticoagulants oraux
EE : Efficacité d'encapsulation	OMS : Organisation mondiale de la santé
ETP : Education thérapeutique du patient	PBS : Phosphate buffer sulfate
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay	PdI : Indice de polydispersité
EPF : European patients forum	PLGA : Acide poly(lactique-co-glycolique)
FDA : Food and drug administration	PVA : Alcool polyvinylique
GLUT : Transporteur de glucose	RCF (g) : Relative centrifugal force
HA : Acide hyaluronique	RPM : Rotation par minute
HBSS : Hank's balanced salt solution	SDS : Dodécyle sulfate de sodium
HLB : Balance hydrophile-lipophile	SC : Sous-cutané
IV : Intraveineux	STZ : Streptozotocine
IM : Intramusculaire	SVF : Sérum de veau foetal
IP : Intrapéritonéal	TVP : Thrombose veineuse profonde

Introductions à la thèse

1 Introduction générale

Adhérence ? Compliance ? Observance ? Avec tous ces termes on s'y perdrait. Il est vrai que ces notions plutôt récentes interrogent de plus en plus sur le suivi de son traitement par un patient. En effet, leur interprétation reste assez subtile mais indispensable pour que le patient puisse pleinement tirer profit de son traitement.

De façon plus précise, l'adhésion thérapeutique à un traitement est aujourd'hui un enjeu économique et sociétal majeur dans la prise en charge du patient. A l'échelle mondiale, on estime que les coûts évitables liés au manque d'adhésion thérapeutique pourraient aller jusqu'à 300 milliards de dollars. En ce qui concerne le taux d'adhésion, celui-ci serait seulement de 50 % en moyenne, plus faible encore dans le cas d'un traitement chronique. En effet, les chiffres parlent de 80% des patients atteints de maladie chronique qui ne suivent pas correctement leur traitement (Lamouroux *et al.*, 2005)

Les causes du manque d'adhésion sont multiples : l'oubli, le manque d'information mais également l'impact réel du traitement sur la vie quotidienne comme la douleur, mais aussi les effets secondaires et indésirables associés. On sait aujourd'hui que ces facteurs sont directement liés à la voie d'administration du traitement. C'est pourquoi, le changement de voie d'administration d'un principe actif peut avoir une réelle influence sur l'adhésion thérapeutique.

Il existe actuellement sur le marché deux principales voies d'administration que sont la voie injectable et la voie orale, la voie orale représentant à elle seule 70% des médicaments administrés de par ces nombreux avantages (indolore, autonomie, faible coût...).

Concernant le marché de l'injectable, les bio-médicaments (issus d'une substance biologique) sont en plein essor et sont largement représentés. Ils sont en effet difficilement administrables par voie orale car rapidement dégradés par le tractus digestif.

C'est le cas de l'insuline par exemple, bio-médicament d'origine protéique et acteur majeur sur le marché de l'injectable. Elle est utilisée dans le traitement du diabète, maladie chronique qui touche plus de 422 millions de personnes dans le monde d'après l'organisation mondiale de la santé (OMS) et dont 20 % sous insulinothérapie ce qui correspond à un marché de plus 38 milliards d'euros.

Mais c'est également le cas de l'héparine, anticoagulant de référence utilisé dans le traitement de la maladie thromboembolique veineuse dont la consommation ne fait que croître. En moyenne, environ 500 millions de doses d'héparine sont administrées chaque année dans le monde représentant un marché mondial estimé à 3,9 milliards de dollars.

C'est dans ce contexte que le Centre européen d'étude du Diabète (CeeD) a développé, en collaboration avec l'Institut Charles Sadron (ICS), un nouveau vecteur pharmaceutique complexe permettant une administration de principes actifs notamment de bio-médicaments par voie orale faisant l'objet d'un dépôt de brevet en 2004 (brevet CeeD/CNRS : WO2004096172). Ce système est composé d'une gélule gastro-résistante renfermant un système nanoparticulaire contenant le principe actif à administrer.

Ce vecteur a déjà démontré sa faisabilité et son efficacité avec l'insuline mais une optimisation reste nécessaire afin d'envisager que ce traitement puisse être adressé aux patients. Ces travaux ont donc consisté en l'optimisation de ce système de double encapsulation pour permettre l'administration orale d'insuline.

En parallèle, le système nanoparticulaire a été transposé à l'héparine, en vue également d'une future administration par voie orale.

2 Etat de l'art

2.1 L'adhésion thérapeutique

2.1.1 Quelques chiffres

On estime aujourd'hui que les coûts évitables liés au manque d'adhésion thérapeutique seraient de l'ordre de 100 à 300 milliards de dollars, soit environ 8 % des dépenses de santé annuelles (Bosworth *et al.*, 2011).

Le taux d'adhésion quant à lui possède une grande disparité selon les études mais serait de 50 % en moyenne selon l'OMS.

Dans le cas des maladies chroniques (diabète, ostéoporose, hypercholestérolémie,...), ce taux chuterait à 40 % (avec un coût estimé à 9 milliards d'euros) d'où l'importance d'une mise en place d'un suivi intensifié pour ce type de pathologies.

C'est dans ce contexte que chaque année des millions de personnes meurent dû à un manque d'adhésion. En Europe, on estime ce chiffre à environ 200 000 personnes (European Patients Forum (EPF)).

2.1.2 Définitions

2.1.2.1 Compliance/observance

La compliance (ou observance), premier terme ayant vu le jour est définie d'après l'OMS comme : « l'importance avec laquelle les comportements (en termes de prises médicamenteuses, de suivi de régime ou de changement de mode de vie) d'un individu coïncident avec les conseils médicaux ou de santé », autrement dit le comportement du patient à suivre parfaitement ses indications thérapeutiques prescrites par le médecin (Y. Cottin *et al.*, 2012).

Mais cette notion de compliance est aujourd'hui très controversée. En effet, l'obéissance associée à ce terme renvoie à une image de soumission du patient à la fois au traitement mais également à son prescripteur (Osterberg *et al.*, 2005). C'est pourquoi aujourd'hui d'autres notions remplacent le terme compliance. C'est le cas de l'adhésion thérapeutique.

2.1.2.2 Adhésion thérapeutique

Le terme adhésion thérapeutique a vu le jour afin de prendre en compte le degré d'acceptation du patient à son traitement. Sa définition d'après l'OMS étant «une appropriation réfléchie de la part du patient sur la prise en charge de sa maladie et de ses traitements, associée à la volonté de persister dans la mise en pratique d'un comportement prescrit » (Y. Cottin *et al.*, 2012). En d'autres termes, l'adhésion fait intervenir les attitudes et la motivation du patient qui doit « adhérer » à son traitement et non s'y soumettre. L'adhésion concerne non seulement le prise médicamenteuse mais également les mesures non pharmacologiques comme l'hygiène de vie comprenant l'alimentation par exemple (Kettler *et al.*, 2002). Ainsi, l'adhésion prend cette fois en compte le patient lui-même et est vue comme une participation active, volontaire et collaborative de celui-ci dans le but de produire un désir de prévention mais surtout un résultat thérapeutique.

De plus, à travers cette notion, une réelle interaction entre le patient et le praticien est donc créée entraînant la responsabilité de ce dernier lors de la survenue d'une non-adhésion. L'adhésion prend également en compte les facteurs psychologiques ou encore environnementaux ce qui permet de mettre en lumière que l'acceptation du traitement par le patient n'est pas figée dans le temps (Lamouroux *et al.*, 2005).

En revanche, cette notion d'adhésion est plus difficilement mesurable que la notion de compliance.

❖ Trois types de non-adhésion

De nombreuses études ont essayé d'établir des « classements » de non compliance/non adhésion. Par exemple, Lask défini trois grades : complètement adhérent, partiellement adhérent ou non compliant (Lask, 1994). Une autre étude présente les catégories suivantes : les patients ayant une compréhension adéquate de leur maladie, ceux qui présentent une résistance psychologique face à leur maladie et enfin ceux qui malgré l'éducation thérapeutique choisissent de ne pas être compliant (Koocher *et al.*, 1990).

Enfin, Jimmy *et al.*, classent la non adhésion en trois catégories que sont l'adhésion primaire, secondaire et tertiaire (Jimmy *et al.*, 2011) classement plus récent et plus simple à expliquer pour le patient où les trois catégories représentant trois différents degrés de non-adhésion.

La non adhésion primaire, appelée aussi adhésion « non respectée » réside dans le fait de ne pas initier son traitement soit en refusant d'aller le chercher en pharmacie ou même tout simplement dans la non-initiation du traitement alors que celui-ci est en notre possession.

La non adhésion secondaire quant à elle peut être définie comme « non persistante » c'est-à-dire qu'elle consiste à stopper son traitement de sa propre volonté mais de façon non intentionnelle dû à une incompréhension, un manque de communication ou encore de ressource.

Enfin, la non adhésion tertiaire dite « non conforme » consiste en l'arrêt du traitement par le patient de façon intentionnelle ou bien en une mauvaise prise de celui-ci passant par des doses non respectées et/ou des oublis par exemple.

Afin d'approfondir cette démarche de prise en compte du patient et d'une réelle relation patient-praticien, le terme de concordance a récemment vu le jour.

2.1.2.3 Concordance

La concordance met l'accent sur l'échange patient-prescripteur sur la base d'une discussion où les points de vue des deux parties sont entendus. Ainsi, les croyances et les préférences du prescripteur et du patient sont pleinement prises en considération, en reconnaissant que les opinions du patient sont primordiales (questions ouvertes entre les deux acteurs). La concordance renvoie donc à une relation égale entre le patient et le praticien (Fraser, 2010). En revanche, ce terme est encore trop peu utilisé à ce jour.

2.1.3 Facteurs et raisons influençant la non adhésion

La non adhésion thérapeutique à un traitement ne doit donc en aucun cas être considérée comme un problème propre au patient. En effet, il provient plutôt d'un manque d'accord entre le professionnel de santé et son patient, notion plus que bien définie dans le terme concordance.

Les raisons de cette non adhésion sont multiples et dépendent de cinq dimensions autour de l'observance qui sont définies précisément par l'organisation mondiale de la santé (OMS) : le traitement, le système de soin, le patient, la maladie et enfin les facteurs démographiques et socio-économiques (Y. Cottin *et al.*, 2012) (Figure 1).



Figure 1 : Dimensions de l'observance selon l'OMS

D'après www.who.int

Parmi ces dimensions, de nombreuses causes influencent la non-adhésion. Parmi elles, l'oubli (patient), le manque d'information données aux patients (système de soin) ainsi que la douleur et l'impact social associés au traitement (Jin *et al.*, 2008) sont les plus répertoriés.

2.1.3.1 L'oubli

L'oubli est la raison la plus commune. Elle est définie par la non adhésion primaire et est associée selon les chiffres à l'initiation au traitement. En effet, 12 % des patients ne vont pas chercher leur traitement. Parmi ceux qui vont le chercher, 12 % ne le commencent pas (DeBrincat, 2012)

2.1.3.2 Le manque d'informations données aux patients

Le manque d'informations met en jeu le patient ainsi que le praticien et peut concerner le choix du traitement mais également le rapport bénéfices/risques ainsi que les symptômes de la maladie. En effet, un médecin prend en moyenne 49 secondes pour expliquer son traitement à un patient (Tarn *et al.*, 2008) ce qui semble trop peu au vu du nombre d'informations dont le patient a besoin pour adhérer à son traitement.

2.1.3.3 Douleur et impact social

La douleur et l'impact sont associés au traitement lui-même. En effet les doses, la fréquence ainsi que les effets secondaires et indésirables peuvent avoir un impact considérable sur la vie du patient et peuvent être directement liés à la voie d'administration représentant également un facteur d'influence (Jin *et al.*, 2008).

2.1.3.4 Deux cas particuliers

2.1.3.4.1 L'adhésion dans les maladies chroniques

De nombreuses études ont montré une forte diminution de l'adhésion thérapeutique dans le cas des maladies chroniques. En effet, comme exposé précédemment, le nombre de prises ainsi que la durée du traitement peuvent avoir un impact majeur sur cette adhésion thérapeutique ce qui est le cas par exemple pour le diabète et les injections pluriquotidiennes d'insuline qui y sont associées (Garcia-Perez *et al.*, 2013). C'est pourquoi, la notion d'adhésion est la plupart du temps utilisée dans le cas de traitements chroniques.

2.1.3.4.2 L'adhésion en clinique

Le taux d'adhésion en essais cliniques est plus élevé et cela s'explique par l'accompagnement et le suivi des patients. En effet, ceux-ci reçoivent beaucoup d'attention pendant l'étude. De plus, les patients sont sélectionnés au préalable pour une meilleure adhésion. Malgré cela, seulement 43 à 78 % d'adhésion selon les études sont observés lors d'essais cliniques dans le cas des maladies chroniques ce qui confirme l'impact réel de la fréquence et la longueur du traitement en lui-même sur cette adhésion malgré un suivi intensif.

2.1.4 Mesure de l'adhésion

Comme dit précédemment, la mesure de l'adhésion est difficilement mesurable dans son intégralité. Mais diverses méthodes existent afin de pouvoir s'en approcher. Ces méthodes peuvent être réalisées de façon directe ou indirecte (Osterberg and Blaschke, 2005).

2.1.4.1 Directe

De manière directe, cela peut aller de la simple observation du patient, en examinant la réponse aux traitements par exemple, ce qui peut être un fort indicateur de l'adhésion thérapeutique. En revanche, dans certaines pathologies cette méthode reste limitée car l'interaction de différents traitements peut biaiser cette réponse.

Une autre stratégie plus concrète consiste à réaliser des examens médicaux (prise de sang ou analyse d'urine) afin de doser les métabolites du traitement dans le cas d'une élimination rénale. Mais cette méthode reste très inconfortable pour le patient qui doit effectuer de nombreux examens afin d'obtenir toutes les réponses nécessaires.

2.1.4.2 Indirecte

De façon indirecte, une méthode simple à mettre en place est le questionnement du patient sur son traitement. En revanche, cette méthode présente un inconvénient qui est le manque d'objectivité du patient à l'égard de son traitement qui a souvent tendance à surestimer sa conformité (Abbott *et al.*, 1996) malgré la facilité et l'accessibilité aux données, compliquant ainsi la mesure.

La seconde stratégie indirecte est d'utiliser des moyens plus techniques comme un moniteur électronique qui enregistre la date et l'heure de chaque prise du traitement. Ces données peuvent ensuite être téléchargées par le praticien. Cette méthode possède l'avantage d'être non invasive et de collecter beaucoup de données sur une longue période. Par contre, elle ne permet pas l'apport d'informations sur son hygiène de vie (sport, alimentation...) nous plaçant ainsi dans un cadre de compliance c'est-à-dire de comportement de prise du médicament uniquement. De plus, son coût reste élevé (Kettler *et al.*, 2002; McNamara *et al.*, 2009; Modi *et al.*, 2006).

2.1.5 Stratégies pour augmenter l'adhésion

La première étape consiste à identifier la mauvaise observance ainsi que ses causes par des questions qui doivent être « ouvertes » afin d'analyser le niveau de non-adhésion du patient et ainsi instaurer un réel accompagnement par la suite (Figure 2).

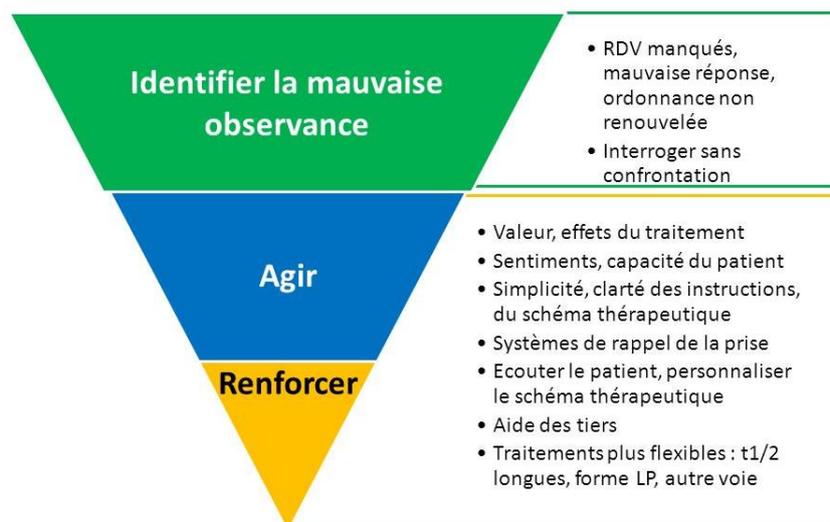


Figure 2 : Les étapes pour augmenter l'adhésion thérapeutique

D'après <http://slideplayer.fr/slide/10055396/>

Le patient doit, dans un premier temps, se sentir soutenu, c'est ce que l'on appelle l'éducation thérapeutique du patient (ETP). Elle est principalement appliquée dans le cas des maladies chroniques. Elle permet en outre d'instaurer la stratégie de base qui est l'instauration d'une relation solide entre le patient et les praticiens (Osterberg and Blaschke, 2005).

2.1.5.1 L'éducation thérapeutique du patient (ETP)

L'ETP est définie par l'OMS comme une façon d'aider les patients à acquérir ou maintenir les compétences dont ils ont besoin pour gérer au mieux leur vie avec une maladie chronique.

Plus concrètement, l'ETP correspond à une réelle prise en charge du patient qui comprend des activités organisées ainsi qu'un soutien psychosocial afin que les patients restent conscients et informés de leur maladie mais aussi des soins, de l'organisation, des procédures hospitalières et des comportements liés à la santé et à la maladie. Cela permet aux patients et à leur famille de mieux comprendre leur maladie et leur traitement. Ils peuvent ainsi mieux assumer leurs responsabilités dans leur propre prise en charge, et améliorer leur qualité de vie.

Les finalités de l'ETP sont l'acquisition et le maintien par le patient de compétences d'auto-soins dans le but de sauvegarder la vie du patient en tenant compte des besoins spécifiques de chaque patient ainsi que le vécu et l'expérience antérieure de celui-ci.

2.1.5.2 La relation patient-médecin

Au-delà de l'ETP qui est un cadre d'accompagnement bien défini, diverses stratégies peuvent également être mises en place au sein même de la relation patient-praticien, répertoriées dans le tableau 1.

La première stratégie est une réelle communication avec les praticiens et une accessibilité à ces informations afin d'éviter les préoccupations de la part du patient. Dans un premier temps, le praticien doit savoir s'adapter à l'éducation et aux croyances de chacun et ainsi adapter l'information fournie dans son discours. De plus, il doit avoir une attitude positive, solidaire et confiante dans sa relation avec son patient. Il doit l'impliquer dans le processus de prise de décision tout en évitant de faire des suppositions sur lui ou sur ses préférences concernant le traitement.

Un exemple commun concerne les effets de l'absence de traitement où les patients ignorent le plus souvent les conséquences que peuvent avoir un retard de prise ou la suppression d'un traitement (Farsaei *et al.*, 2014).

Stratégies	Interventions spécifiques
Simplification du traitement	Ajustement des doses, fréquence, heures Adapter aux activités du patient Utilisation d'outils comme des alarmes, piluliers...
Communiquer les connaissances sur le traitement	Discussion avec les praticiens (infirmière, médecin, pharmacien) Distribution d'informations écrites + sites internet
Modifier les croyances du patient	Balance bénéfices/risques Récompenses Réduire les imprévus
Communication avec le patient et sa famille	Messages directes, écoute active Faire des rappels Prise de rendez-vous Inclure le patient dans les décisions Visite à domicile Support familiale
Supprimer les préjugés	Augmenter la compréhension du traitement
Evaluer l'adhésion	Rapport (par le patient) Compteur de pilule ou examens médicaux

Tableau 1 : Stratégies pour augmenter l'adhésion thérapeutique

D'après (Atreja et al., 2005)

La seconde stratégie est d'agir sur le traitement en lui-même, le but étant de simplifier le quotidien du patient par la modification des spécificités du traitement. Celles-ci peuvent être la fréquence de prise, la posologie, les effets secondaires et indésirables ou encore la douleur

du traitement. Celles-ci peuvent être adaptées aux activités quotidiennes du patient et ainsi augmenter l'adhésion thérapeutique.

Les spécificités d'un traitement ont donc un réel effet sur l'adhésion thérapeutique accentué dans le cas des maladies chroniques.

Il est également connu que ces spécificités peuvent être largement influencées par la voie d'administration du médicament (Kelloway *et al.*, 1994). En effet, dans un traitement chronique, la voie d'administration peut être plus ou moins adaptée à la vie quotidienne du patient devenant plus ou moins contraignante. Elle peut également réduire certains effets indésirables ou être moins douloureuse (EPF, 2015 ; (Farsaei *et al.*, 2014)) ce qui pourrait donc engendrer un effet sur l'adhésion thérapeutique.

C'est pourquoi une stratégie de changement de voie d'administration est envisageable pour certains bio-médicaments administrés de façon chronique.

2.2 Les bio-médicaments et leur voie d'administration

2.2.1 Les bio-médicaments

Les bio-médicaments sont définis comme diverses classes de médicaments dont le point commun est de faire appel à une source biologique comme matière première du principe actif qu'ils renferment (Leem). Ils sont aujourd'hui en plein essor avec une augmentation de mise sur le marché Français constante depuis plus de 20 ans. En 2014, on dénombrait 173 bio-médicaments commercialisés en France (Figure 3).

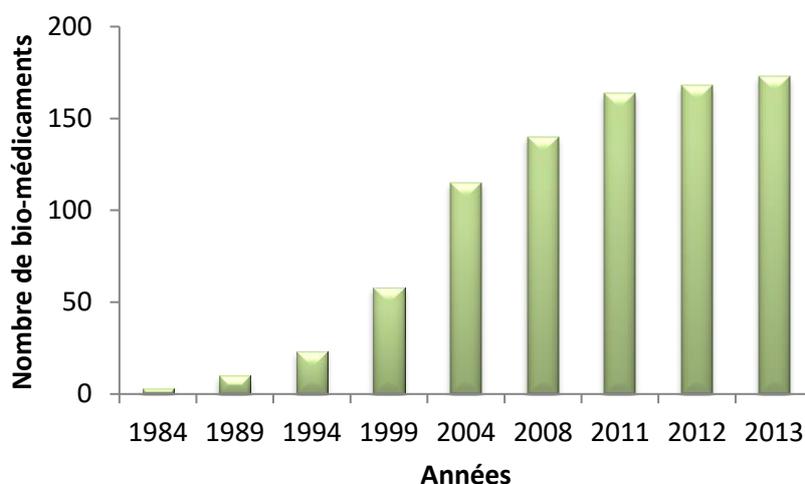


Figure 3 : Nombre de bio-médicaments commercialisés en France par année

D'après www.leem.org

En 2017, sept des dix médicaments les plus vendus étaient des bio-médicaments (Genetic engineering and Biotechnology News).

Ils existent de nombreuses catégories de bio-médicaments réparties dans différents domaines pharmacologiques dont les trois principales sont les vaccins, les protéines thérapeutiques et les anticorps monoclonaux représentant environ 60 % des bio-médicaments commercialisés (Figure 4).

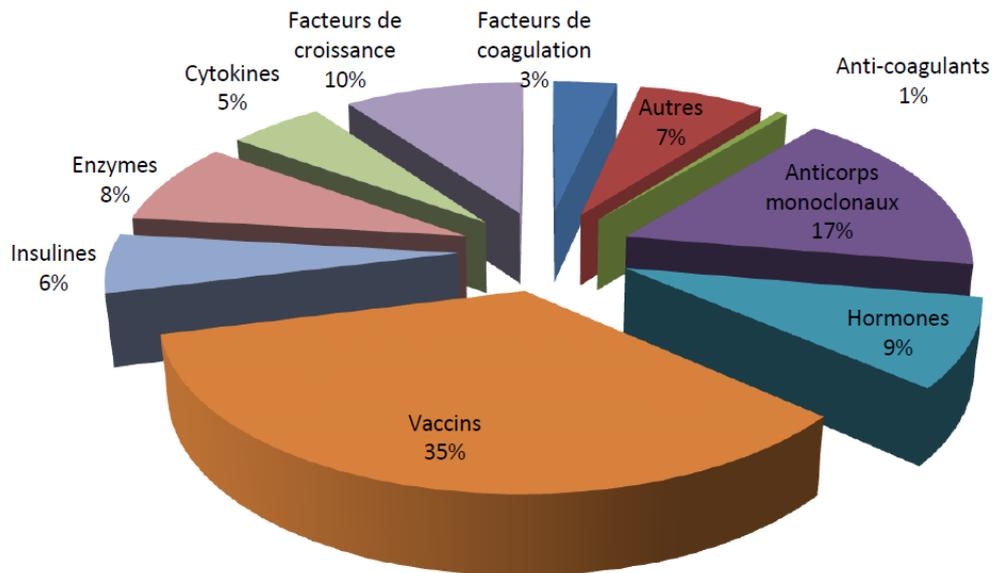


Figure 4 : Domaines pharmacologiques des bio-médicaments commercialisés en France en 2013 (en %)

D'après www.leem.org

Mais d'autres domaines pharmacologiques avec les facteurs de croissance, les facteurs de coagulation ou encore les anticoagulants ne sont pas à négliger.

L'inconvénient majeur des bio-médicaments est lié à leur mode d'administration, uniquement par voie injectable. Ils ont en effet la particularité d'être pour la plupart d'origine protéique et seront donc dégradés dans le tractus digestif. De plus, la plupart des bio-médicaments sont des molécules de taille importante. Leur absorption par voie orale est donc complexe.

2.2.2 La Voie d'administration des bio-médicaments : la voie parentérale

La voie injectable est la voie utilisée pour l'administration de bio-médicaments de par leur sensibilité aux différentes barrières de l'organisme rencontrées avec la plupart des autres voies d'administration. En effet, la voie injectable est la voie d'administration la plus directe,

sans barrière et permet donc un contact direct avec le sang ou les liquides interstitiels entraînant un effet rapide.

En revanche, d'un point de vue adhésion thérapeutique, la douleur de l'injection et le risque d'infection peuvent avoir un réel effet négatif.

Les principaux modes de pénétration par voie parentérale sont la voie intraveineuse, la voie intramusculaire et la voie sous-cutanée (Jin *et al.*, 2015).

D'abord, la voie intraveineuse (IV) est la voie d'urgence avec un effet très rapide après environ 15 secondes. Cette voie est également privilégiée dans le cas de médicaments non tolérés en sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM). Les solutions doivent être aqueuses ou émulsionnées pour pouvoir être administrées. Par exemple, l'héparine type Choay®, anticoagulant est un bio-médicament administré par voie intraveineuse dans le traitement curatif d'urgence des thromboses veineuse profondes et de ses complications associées.

Mais également, la voie sous-cutanée a une action plutôt lente et utilisée principalement pour des médicaments en solution aqueuse. Cette voie possède l'inconvénient d'être douloureuse, avec un risque infectieux assez important ainsi qu'une restriction au niveau du volume d'injection. Malgré cela, de nombreux bio-médicaments sont administrés par voie sous-cutanée de par sa durée d'action variable selon le principe actif. C'est le cas de l'insuline dont l'action varie de 10 minutes à 42 heures selon le type d'insuline administrée. Certains bio-médicaments peuvent également être implantés sous la peau et permettre une administration sur du long terme (Guarnieri, 2014) comme par exemple l'implant contraceptif ayant une durée d'action jusqu'à trois ans. Enfin, les vaccins, bio-médicaments les plus commercialisés sont également administrés par cette voie.

Puis la voie intramusculaire qui permet principalement l'injection de préparations spécifiques, comme des solutions lipophiles autrement plus douloureuses lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée. Au niveau de la vitesse d'action, celle-ci est comparable à la voie sous-cutanée. En revanche, le risque est plus important comme celui d'une piqûre nerveuse ou vasculaire mais elle présente également un risque infectieux et hémorragique potentiel. Enfin, la voie IM peut également être assez douloureuse (Nicoll *et al.*, 2002).

Enfin, une autre voie utilisée principalement en préclinique est la voie intrapéritonéale (IP). C'est une voie parentérale qui permet une action rapide du principe actif, avec une vitesse d'action supérieure aux voies sous-cutanée et intramusculaire. Elle présente une diffusion dans la cavité péritonéale facilitée par rapport aux voies sous-cutanée ou intramusculaire par

exemple. D'autre part, cette voie d'administration respecte un premier passage hépatique avant d'atteindre la circulation générale (Liu *et al.*, 2003) (voir paragraphe 2.2.3 pour la définition du premier passage hépatique).

2.2.3 La voie orale, une voie d'administration stratégique

La voie orale est la voie la plus utilisée pour l'administration des médicaments en 2014 représentant 70 à 80 % des médicaments administrés sur le marché en France (ANSM, 2014). C'est une voie d'administration lente due à une absorption en plusieurs étapes et qui possède l'inconvénient de ne pas pouvoir être utilisée sur un patient inconscient. En revanche, cette voie présente de nombreux avantages comme une prise médicamenteuse aisée, sans douleur et sans matériel donc bien acceptée par le patient (Yun *et al.*, 2013). De plus, des doses importantes peuvent être administrées en une seule prise.

D'un point de vue physiologique, cette voie est caractérisée par son tractus gastro-intestinal, une surface d'absorption intestinale importante (200m²) mais également par la présence d'enzymes et de variations de pH (Liu *et al.*, 2003).

Par voie orale, le médicament suit donc le cheminement suivant : une prise par la bouche, le médicament rejoint ensuite l'estomac, le petit intestin, le gros intestin, le foie par la veine porte et son premier passage hépatique avant d'atteindre la circulation sanguine et l'organe cible (Figure 5).

Arrêtons-nous sur le foie qui joue un rôle capital. En effet, il a pour rôle de métaboliser certains principes actifs grâce à ses enzymes en un ou plusieurs composés (métabolites) grâce à deux phases de réactions que sont une réaction d'oxydation/réduction ou d'hydrolyse par le cytochrome P450 puis une phase de conjugaison soit de glucides ou de sulfates permettant de conférer des propriétés hydrosolubles aux principes actifs qui vont ensuite être éliminés par les urines ou la bile.

Pour certains principes actifs, ces métabolites associés peuvent être toxiques, la voie parentérale sera donc privilégiée.

En revanche, pour d'autres principes actifs, les métabolites peuvent être actifs ou inactifs pharmacologiquement entraînant une régulation de la dose de principe actif atteignant la circulation sanguine. C'est le cas de l'insuline par exemple, bio-médicament aujourd'hui administré par voie injectable et qui ne bénéficie donc pas d'un premier passage hépatique

par cette voie entraînant des effets indésirables conséquents comme des hypoglycémies sévères (Gedawy *et al.*, 2018). La métabolisation hépatique permettrait donc de réguler la quantité d'insuline dans le sang afin de se rapprocher d'une sécrétion physiologique.

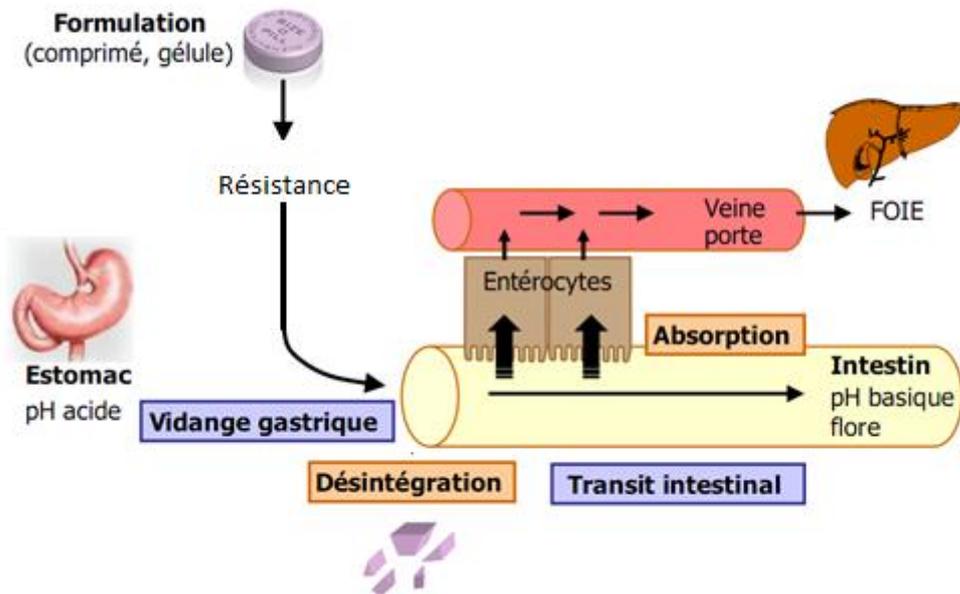


Figure 5 : Les étapes de l'absorption orale d'un principe actif dans un comprimé gastro-résistant

Modifiée d'après <http://slideplayer.fr/slide/11749897/>

2.2.4 Physiologie de la voie orale

2.2.4.1 Le tractus gastro-intestinal (GI)

D'un point de vue physiologique, la voie orale est principalement caractérisée par son tractus gastro-intestinal, un tube musculaire digestif différencié en plusieurs organes, l'estomac et les intestins que sont l'intestin grêle et le gros intestin (Liu *et al.*, 2003).

2.2.4.2 Physiologie de l'estomac

L'estomac est un organe creux qui se situe dans la partie gauche de la cavité abdominale juste sous le diaphragme et qui a pour rôle de stocker les aliments, d'amorcer leur digestion puis de les délivrer progressivement à une partie de l'intestin grêle, le duodénum. Au niveau de sa structure, il est composé d'un épithélium épais, d'une muqueuse mal vascularisée, d'une surface limitée (environ 1 m²) et d'un pH très acide variant de 1,2 à 3 (Tsai *et al.*, 2013). Ce pH est dû à la production d'acide chlorhydrique jouant un rôle dans la dénaturation des protéines (facilitant leur digestion enzymatique), un rôle bactéricide ainsi qu'un rôle ionisant (production de cations divalents (Fe²⁺, Zn²⁺, ...) favorisant l'absorption de certaines protéines.

De plus, de nombreuses enzymes gastriques comme la pepsine ou la lipase (Liu *et al.*, 2003) sont présentes dans l'estomac et participent activement à la dégradation des aliments en protéines et autres glucides.

Une fois réduits en sous unités (protéine, lipides, sucres), les aliments seront absorbés notamment au niveau de l'estomac. Pour faciliter cette absorption, d'autres facteurs entrent en jeu comme le caractère lipophile des molécules à absorber ou encore des caractéristiques liées à l'estomac lui-même. L'absorption est conditionnée par exemple par l'état de vacuité de l'estomac sous la dépendance des prises alimentaires mais également par le temps de contact (entre les molécules et l'estomac), le temps de vidange gastrique (~2 à 3 heures) ou encore le flux sanguin gastrique. L'estomac reste tout de même un organe à faible capacité d'absorption où peu de principes actifs y seront absorbés hormis l'aspirine et l'alcool, contrairement à l'intestin grêle.

2.2.5 Physiologie de l'intestin

Directement relié à l'estomac par le duodénum, le petit intestin ou encore nommé intestin « grêle » est la portion supérieure des intestins située dans le tube digestif, s'étendant jusqu'au gros intestin avec lequel il communique par la valvule iléo-caecale. La longueur de l'intestin grêle chez l'homme est de huit mètres et constitue à lui seul les quatre cinquièmes de l'étendue totale du tube digestif. Il se subdivise en trois parties que sont : le duodénum, le jéjunum et enfin l'iléon. Le duodénum mesure 18 à 20 centimètres. Il est principalement caractérisé par sa paroi composée de quatre enveloppes : la tunique séreuse, la tunique musculuse, la tunique celluleuse et la tunique muqueuse. Le jéjunum est la partie centrale de l'intestin grêle et peut mesurer de 2 à 8 mètres de long chez l'Homme adulte. Enfin, l'iléon représente la partie inférieure de l'intestin et est caractérisé par la présence de plaques de Peyer dans sa partie terminale, agrégats de follicules lymphoïdes (lymphocytes B et T) primaires et secondaires caractérisés par la présence de cellules spécifiques (cellules M) qui seront expliquées plus en détails dans la partie 2.2.6.1.

Le petit intestin possède l'avantage d'avoir une grande surface d'échange au niveau de son épithélium grâce aux nombreuses villosités et microvillosités (environ 200 m²) ainsi qu'une importante vascularisation de la muqueuse nécessaire à l'absorption des nutriments apportés

par l'alimentation. Au niveau de son pH, celui-ci varie le long de l'intestin allant de 6,5 à 8 (Gedawy *et al.*, 2018). Différents facteurs entrent également en jeu dans l'absorption de principes actifs au niveau de l'intestin grêle comme l'état de vacuité intestinale, le péristaltisme intestinal (contractions musculaires) conditionnant le temps de transit et donc de contact entre le principe actif, la muqueuse intestinale et le flux sanguin intestinal.

De plus, l'intestin grêle est composé de nombreuses enzymes au niveau de sa lumière et de sa bordures en brosse comme la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase ou la lipase (Hamman *et al.*, 2005) (Figure 6).

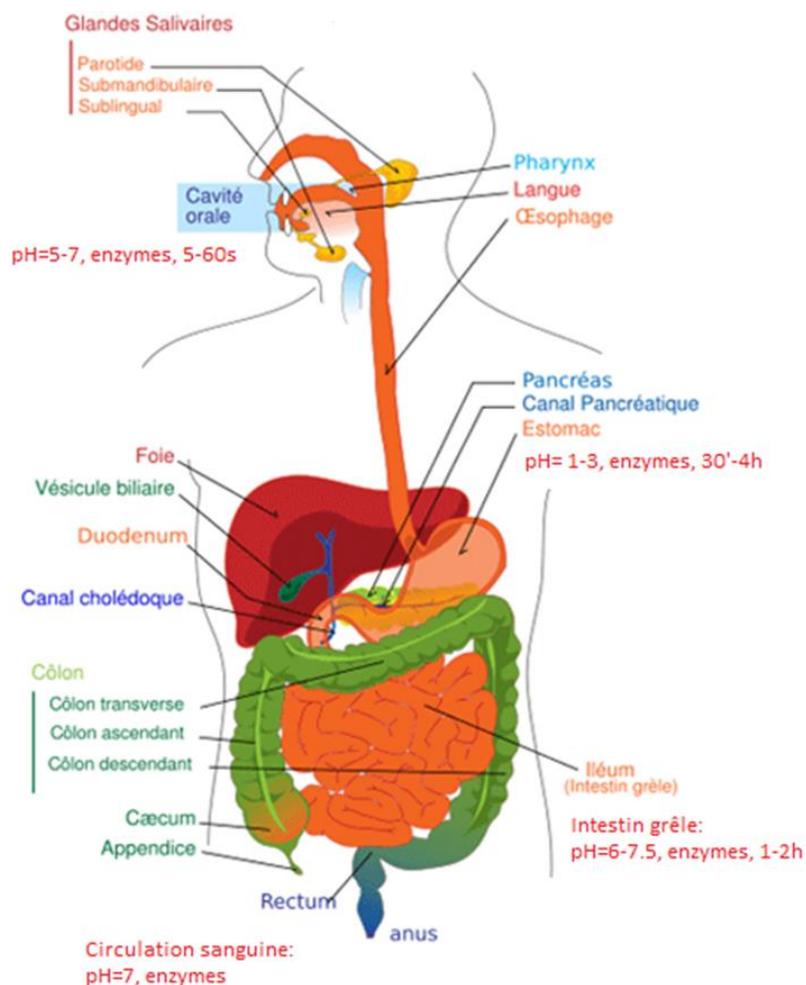


Figure 6 : Composition et caractéristiques du tractus gastro-intestinal

D'après (McClements *et al.*, 2016) (illustration tirée et modifiée)

2.2.6 L'épithélium intestinal

Comme dit précédemment, la surface intestinale est très grande attribuée principalement au repliement de l'épithélium intestinal organisé sous forme de villosités (Figure 7). Sa structure cellulaire limite le passage par voie passive de molécules lipophiles et de poids moléculaire inférieur à 700 Da (Muheem *et al.*, 2016), grâce à différents types cellulaires.

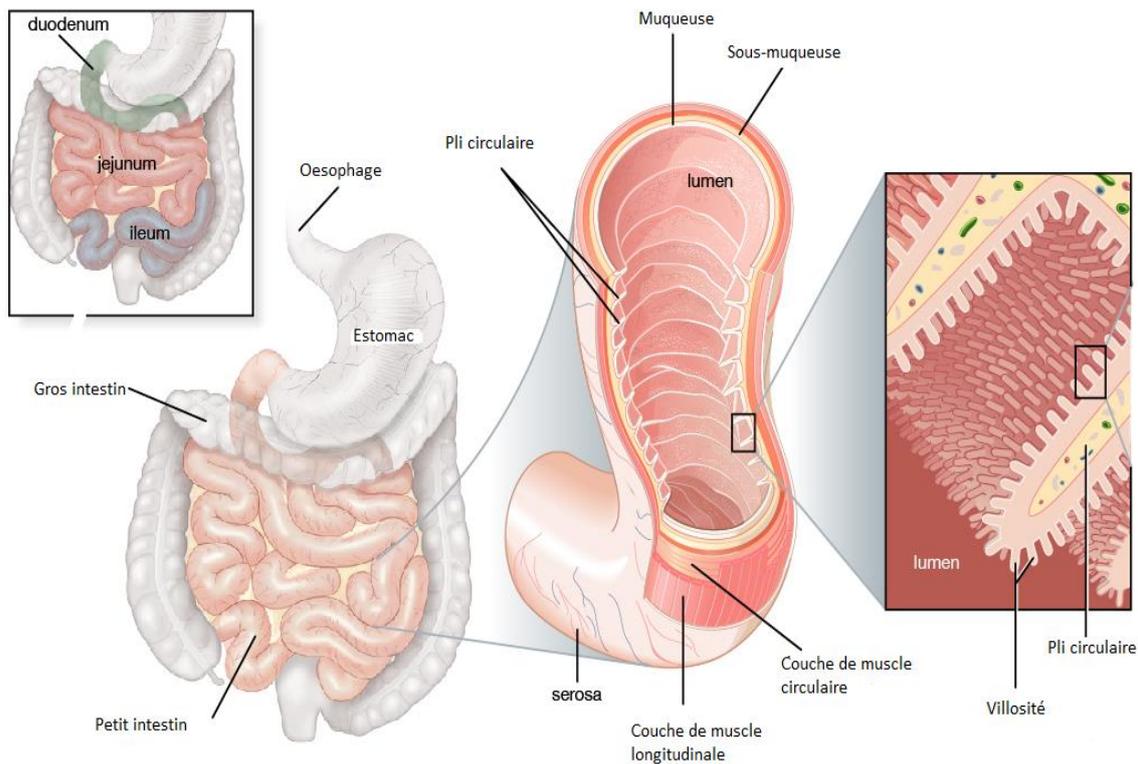


Figure 7 : Structure de l'épithélium intestinal

D'après Encyclopedia Britannica, Inc (illustration tirée et modifiée)

2.2.6.1 Composition cellulaire

L'épithélium intestinal est majoritairement composé d'entérocytes à une proportion de 90 % formant une bordure en brosse très dense composée de microvillosités (Figure 7) ayant pour fonction l'absorption de nutriments par un mécanisme de transport (Gedawy *et al.*, 2018). Les cellules caliciformes (goblet), représentant les deuxièmes cellules les plus abondantes (8 %) ont quant à elles la particularité de sécréter du mucus intestinal et de le stocker.

Les deux pourcents restant sont partagés entre les cellules de paneth qui ont une fonction antimicrobienne en sécrétant des protéines permettant de tuer les bactéries non désirées et

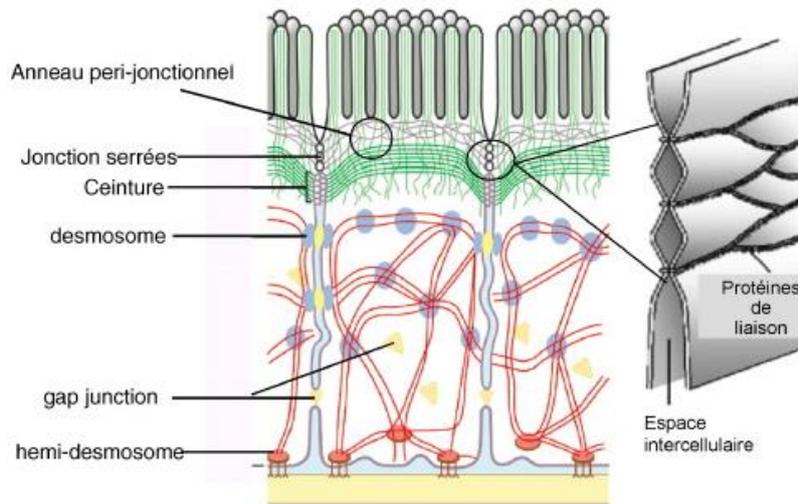


Figure 9 : Représentation des jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal

D'après (Bueno, 2010)

Les jonctions serrées, appelées aussi *zonula occludens* de par leur forme de bandelettes, sont présentes à la surface apicale des cellules. Le terme *occludens* vient du fait que leur fonction consiste en l'obturation d'espaces entre les différents types de cellules de l'épithélium. Ces jonctions empêchent tout échange moléculaire entre le côté luminal et le côté apical de l'épithélium. En revanche, le passage ionique reste possible. Les *zonula occludens* sont constituées de plusieurs protéines transmembranaires qui jouent le rôle de contact entre les cellules adjacentes de l'épithélium. Parmi elles, l'occludine et les claudines 1 et 2 ont été identifiées et établissent des liaisons intramembranaires dont les claudines jouent le rôle de fixateur et l'occludine de modulateur/coordonateur (Figure 10) (Mitic *et al.*, 2000). Une autre protéine transmembranaire est également présente au niveau des jonctions serrées, c'est la molécule d'adhésion des jonctions (JAM) qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Ces protéines transmembranaires sont associées à d'autres protéines comme la ZO-1 (*Zonula Occludens-1*), la ZO-2, la ZO-3. La ZO-1 interagit avec la spectrine, elle-même reliée aux microfilaments d'actine du cytosquelette (Van Itallie, 2004). Ces jonctions serrées vont jouer le rôle de filtre pour les grosses molécules avec un espace paracellulaire de 1,5 nm (Yun *et al.*, 2013) variant d'un morceau d'intestin à l'autre.

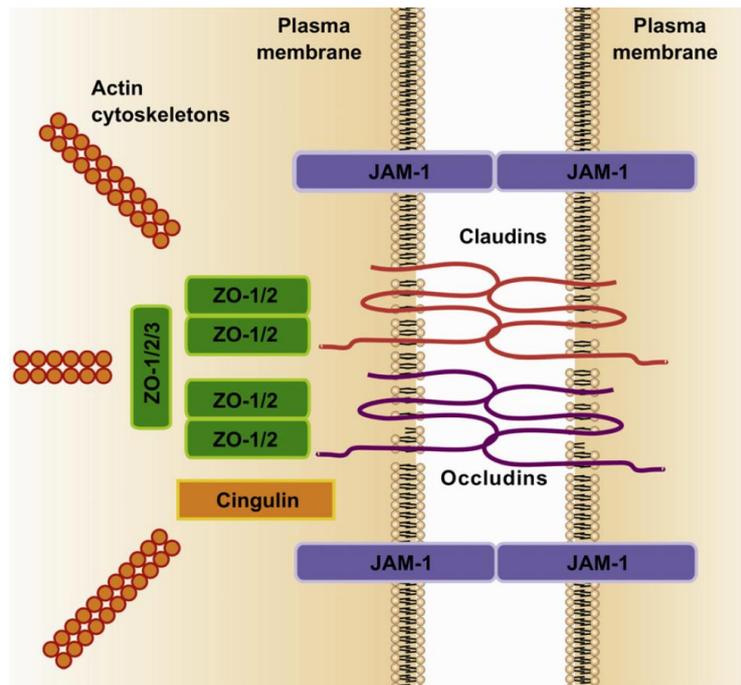


Figure 10 : Structure d'une jonction serrée

D'après Chen et al., 2011

Les jonctions d'adhérence appelées également *zonula adherens* ou desmosomes quant à elles sont des jonctions formées par l'intermédiaire des cadhérines classiques, molécules transmembranaires responsables d'une adhérence calcium dépendante. Bien que l'adhérence de ces molécules dépende de leur domaine extracellulaire, celle-ci est modulée par trois molécules cytoplasmiques, les caténines (alpha et bêta caténines) qui se lient d'une part au domaine cytoplasmique des cadhérines via la p210 et d'autre part par l'intermédiaire de nombreuses protéines cytoplasmiques aux filaments d'actine reliées entre elles par des molécules d'alpha-actinine.

Les jonctions de communication (GAP jonctions) permettent à de petites molécules (vitamines, acides aminés, ...) de passer directement du cytoplasme d'une cellule à l'autre. Ce sont en fait les membranes des deux cellules communicantes qui possèdent des protéines appelées connexines qui forment des hexamères (appelés connexon) permettant cet échange.

2.2.6.1.1 Le mucus intestinal

Une autre barrière protectrice existe à la surface de l'estomac et de l'épithélium intestinal : le mucus. En effet, l'épithélium intestinal est recouvert d'une couche produite par les cellules caliciformes en continu et qui joue un rôle déterminant dans l'absorption des principes actifs

administrés par voie orale. En effet, le mucus est une sorte d'hydrogel qui joue un rôle protecteur en créant une barrière physique entre le tissu sous-jacent et les micro-organismes, les toxines qu'ils produisent et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale (Ensign *et al.*, 2012). Son épaisseur varie le long du tractus gastro-intestinal ce qui le rend plus ou moins adhérent selon les parties du tractus GI (Figure 11) mais varie également d'une espèce à l'autre. Par exemple, celle-ci est plus importante chez l'homme que chez la souris ou le rat (Ensign *et al.*, 2012).

Ce mucus est principalement composé de mucines, polymère de grande taille, composé de monomères de glycoprotéines hautement glycosylées lui conférant ses propriétés gélifiantes et une charge de surface négative due à la présence des ions OH^- , COO^- et NH_2^- (Heinemann *et al.*, 2009). De nombreuses interactions électrostatiques, ioniques ou encore de Van der Waals sont donc possibles et ne sont pas à négliger (Yun *et al.*, 2013) pour le transport de molécules.

Une autre couche moins référencée constituant une barrière protectrice est le glycocalyx. Il s'agit d'une couche composée de mucopolysaccharides sulfatés qui constitue avec le mucus une barrière aux peptides et aux protéines. Cette couche tout comme le mucus est très visqueuse (Yun *et al.*, 2012) et empêche le contact avec la membrane cellulaire.

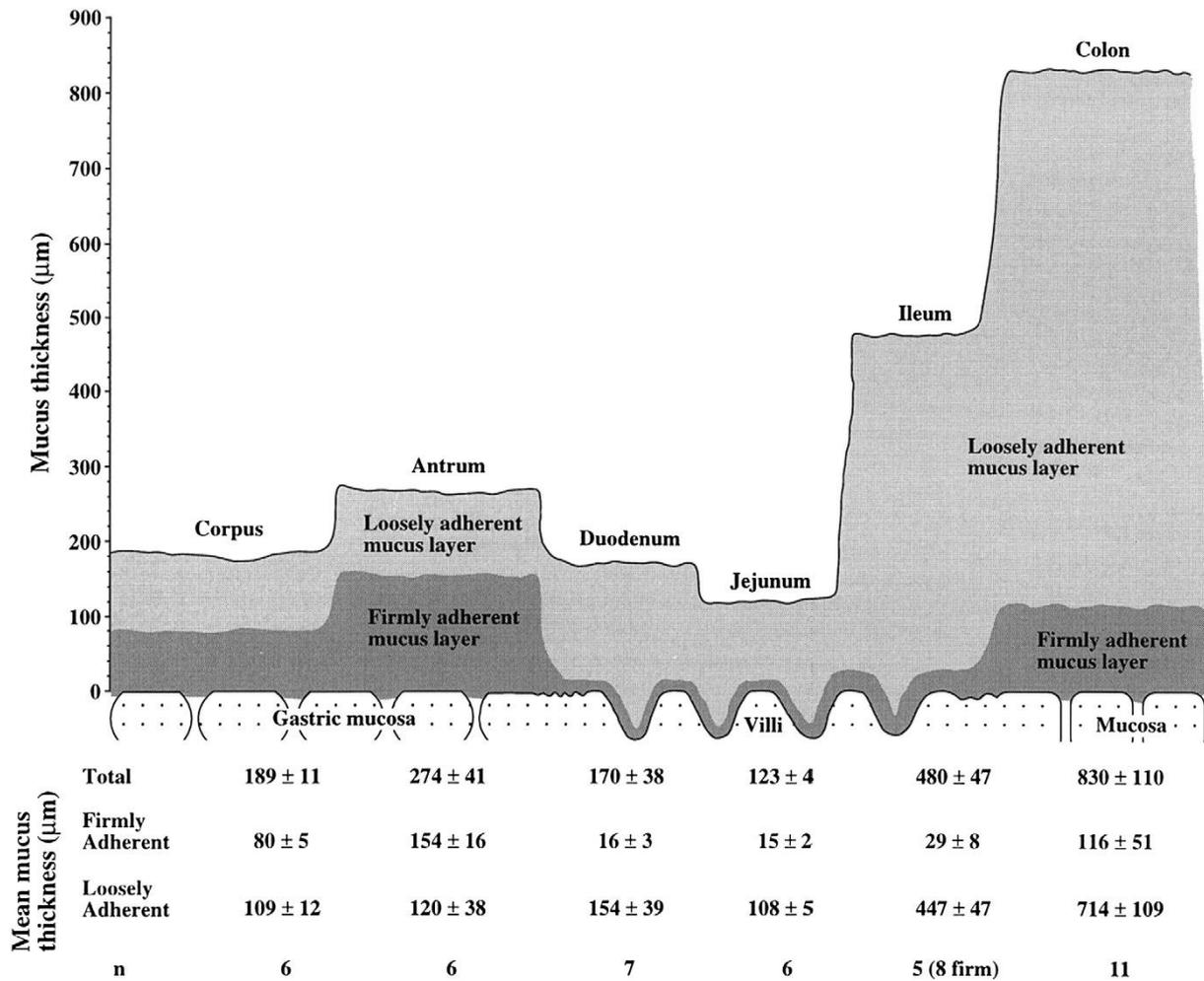


Figure 11 : Schéma de l'épaisseur des couches de mucus dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal chez le rat

D'après (Ensign et al., 2012)

2.2.7 Transport des molécules à travers l'épithélium intestinal

Au vu de la barrière que représente l'épithélium intestinal, le transport de molécules est complexe et peut être médié par deux mécanismes dépendant de la structure cellulaire de l'épithélium : le transport paracellulaire ou le transport transcellulaire (Figure 12).

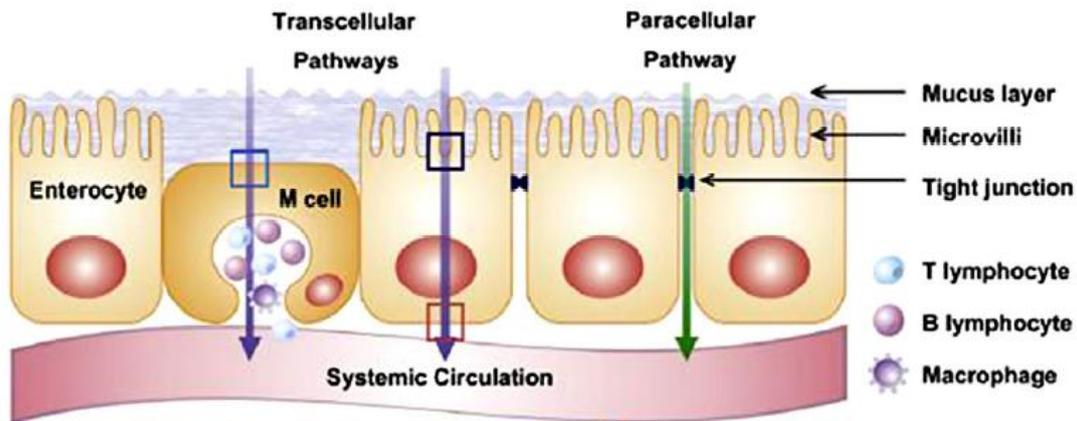


Figure 12 : Mécanismes de transport des molécules à travers l'épithélium intestinal

D'après (Chen et al., 2011)

2.2.8 Transport paracellulaire

Le transport paracellulaire est le passage des molécules par les espaces intercellulaires c'est-à-dire entre les cellules épithéliales. Ce type de transport est passif et sous le contrôle des jonctions serrées principalement présentes au niveau de ces espaces et est particulièrement utilisé par les molécules hydrophiles de moins de 1 nm (Gedawy et al., 2018).

Ces espaces intercellulaires au niveau des jonctions ne représentent que 0,01 % de la surface totale d'absorption ce qui réduit considérablement l'utilisation de cette voie de passage par les molécules.

2.2.9 Transport transcellulaire par les entérocytes

Le transport cellulaire utilise un mécanisme de transcytose pour passer la barrière intestinale et dépend des propriétés physico-chimiques des molécules comme la taille, la charge, la lipophilie, son potentiel de liaison hydrogène ou encore la présence de ligand à la surface. Celui-ci peut être médié par les cellules M des plaques de Peyer ou par les entérocytes qui représentent la majorité cellulaire de l'épithélium.

Ces mécanismes d'absorption peuvent être de quatre formes différentes : la phagocytose restreinte aux cellules M, l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéoline-dépendante et la macropinocytose (Saptarshi et al., 2013) (Figure 13).

La phagocytose est considérée comme une forme d'endocytose, mécanisme utilisé généralement par la cellule pour assimiler des nutriments ou pour éliminer des molécules et basé sur la formation de vésicules de capture provenant de la membrane plasmique. La

phagocytose permet l'internalisation de molécules de taille supérieure à 500 nm. Elle est également déclenchée par un contact direct entre la cellule et la molécule.

La voie d'endocytose clathrine dépendante responsable de 40 à 50 % de l'endocytose tire son nom du constituant majeur des structures membranaires, la clathrine, protéine structurale des vésicules formées.

La voie d'endocytose cavéoline dépendante doit son nom à la cavéoline, protéine qui se lie au cholestérol et permet à l'aide des vésicules de petite taille (50 à 80 nm) l'internalisation des lipides et des protéines (albumine, toxine du choléra...). Ce mécanisme n'est que peu couramment rencontré.

Enfin la macropinocytose est un mécanisme utilisant des vésicules de grande taille (1 µm) et dépendant de l'actine (froncement de la membrane formant la vésicule). Ce mécanisme sera donc utilisé pour l'internalisation de grosses molécules préférentiellement dans les cellules M.

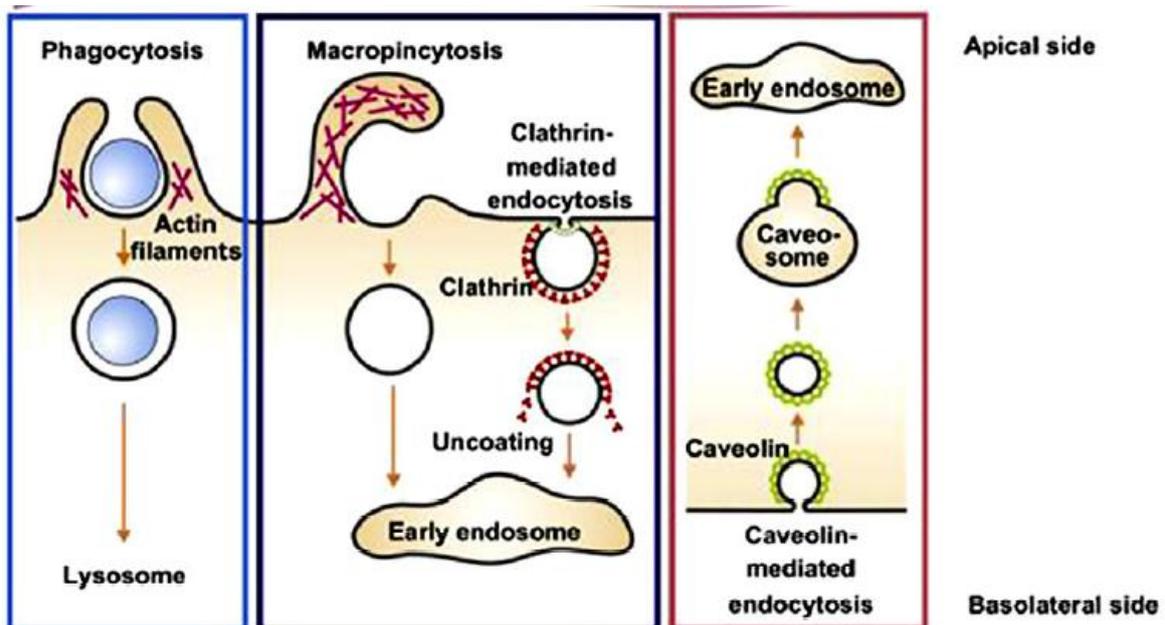


Figure 13 : Mécanisme d'internalisation des molécules à travers l'épithélium intestinal

D'après (Chen et al., 2011)

De part ses nombreux avantages, la voie orale est la voie d'administration idéale pour l'administration de principes actifs synthétiques comme le paracétamol ou encore l'aspirine qui montrent une forte biodisponibilité par cette voie car résistants aux spécificités du tractus digestif.

En revanche pour l'administration des bio-médicaments par exemple, ces spécificités sont de réelles barrières à leur administration par voie orale que nous allons plus amplement détailler.

2.3 Les barrières de la voie orale pour l'administration de bio-médicaments

Comme présentées en détails dans la partie 2.2.4, la structure et la composition du tractus gastro-intestinal représente donc une limite à l'administration par voie orale des bio-médicaments d'origine protéique où la taille des molécules semble être importante.

Ces barrières peuvent être de trois types : physiques, chimiques ou biologiques et dépendent donc du type de bio-médicament voulant être administré par voie orale.

2.3.1 Physiques

La barrière physique est donc directement liée à la structure de l'épithélium intestinal. En effet, sa structure en microvillosités est composée d'une structure cellulaire complexe ainsi que de différentes jonctions cellulaires comme les jonctions serrées empêchant le passage de molécules supérieures à 1,5 nm (Masahiro Hayashi, 1997). Les bio-médicaments comme les polysaccharides, les anticorps ou encore certaines protéines sont des grosses molécules. De plus, la présence de mucus continuellement secrété et négativement chargé amplifie la barrière physique sur lequel la charge, la polarité ainsi que la taille des principes actifs à administrer vont avoir une influence importante.

2.3.2 Chimiques

Les barrières chimiques sont principalement représentées par les variations de pH le long du tractus gastro-intestinal allant de 1,2 à 3 en milieu gastrique et de 6.5 dans le duodénum à 8 dans l'iléon. Ces variations de pH entraînent la dénaturation des bio-médicaments pour la plupart d'origine protéique.

2.3.3 Biologiques

La présence de nombreuses enzymes au niveau du tractus gastro-intestinal représente une barrière biologique efficace à l'administration des médicaments d'origine biologique. En effet celle-ci commence par la protéolyse au niveau de l'estomac par la présence de pepsine et continue dans les intestins avec la chymotrypsine, l'élastase et les carboxypeptidases. La présence de ces enzymes entraîne la dégradation des médicaments de nature protéique.

Les barrières énoncées sont donc un frein à l'administration orale de la plupart des bio-médicaments, administrés de façon chronique. C'est le cas de l'insuline, protéine administrée dans le traitement du diabète mais aussi de l'héparine, traitement anticoagulant auquel nous nous sommes plus particulièrement intéressés durant ces travaux.

2.4 Les bio-médicaments d'intérêts pour la voie orale

2.4.1 L'insuline par voie orale

2.4.1.1 Pourquoi ?

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante du corps, administrée de façon exogène dans le traitement du diabète par voie injectable. Cette voie d'administration lui confère de nombreux désavantages comme la douleur, la gêne de l'injection mais également des complications sévères (hypoglycémies et hyperglycémies) dues à une administration non physiologique.

En effet, des études ont montré que seulement 50 % des diabétiques atteignaient leur objectif glycémique, qui pourrait être associé à une faible adhésion (Garcia-Perez *et al.*, 2013) de par la complexité du traitement (voie injectable) et ses effets indésirables associés.

2.4.1.2 Le marché de l'insuline

Il existe aujourd'hui 422 millions de personnes diabétiques dans le monde dont environ 20 % sous insulinothérapie, représentant donc environ 100 millions de personnes prenant de l'insuline quotidiennement (chiffres OMS).

Ce bio-médicament représentait à lui seul un marché de 38 milliards d'euros en 2016 avec des estimations à 50 milliards d'euros pour 2020.

Les chiffres de 2016 montrent que la majorité des pays consacrent 5 % à 20 % de leurs dépenses de santé au traitement du diabète représentant au total 12 % des dépenses de santé mondiale chiffrées à 727 milliards de dollars.

En France, le coût pour l'Assurance-maladie s'élevait à 8 milliards d'euros, soit 5 % des dépenses de santé incluant les consultations, les médicaments, les hospitalisations, ainsi que les indemnités journalières de maladie ce qui situe la France dans une fourchette basse par rapport au reste du monde.

Deux acteurs principaux se partagent ce marché qui sont Novonordisk, entreprise Danoise largement en tête avec 1,2 milliards de dollars de ventes en 2016 et Sanofi, acteur Français avec 6,9 milliards. Lilly, acteur américain et à l'origine de la première insuline en 1923 n'est aujourd'hui que troisième leader mondial.

2.4.1.3 La molécule d'insuline

L'insuline est un polypeptide composé de 51 acides aminés reliés entre eux par deux ponts disulfures stables au niveau des cystéines, A (21 acides aminés) et B (30 acides aminés) (Brange *et al.*, 1993). Elle possède une masse moléculaire de 5800 Da et se présente spatialement sous la forme d'un hexamère composé de trois dimères situés autour d'un axe ternaire passant par trois atomes de zinc (Figure 14).

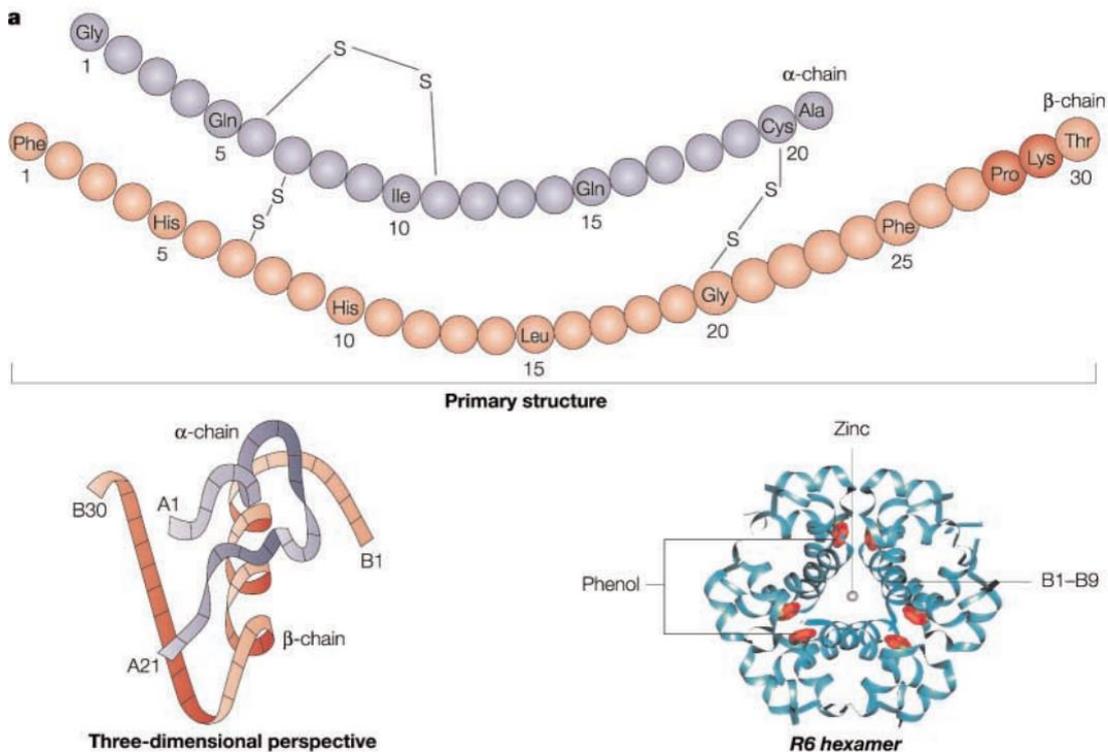


Figure 14 : Structure primaire et configuration spatiale de la molécule d'insuline

D'après (Owen, 2002)

C'est une hormone sécrétée par le pancréas et plus particulièrement par les cellules β des îlots de Langerhans selon un schéma bien spécifique (Figure 15). Elle est synthétisée à partir d'une pré-hormone appelée pré-pro-insuline. La première étape est sa transformation en pro-insuline après suppression d'un peptide appelé « peptide signal » qui est stocké dans des microvésicules où s'amorce sa conversion en insuline. La structure de la pro-insuline obtenue

comporte quant à elle la molécule d'insuline ainsi qu'un peptide de connexion au milieu appelé peptide-C (Weiss *et al.*, 2000).

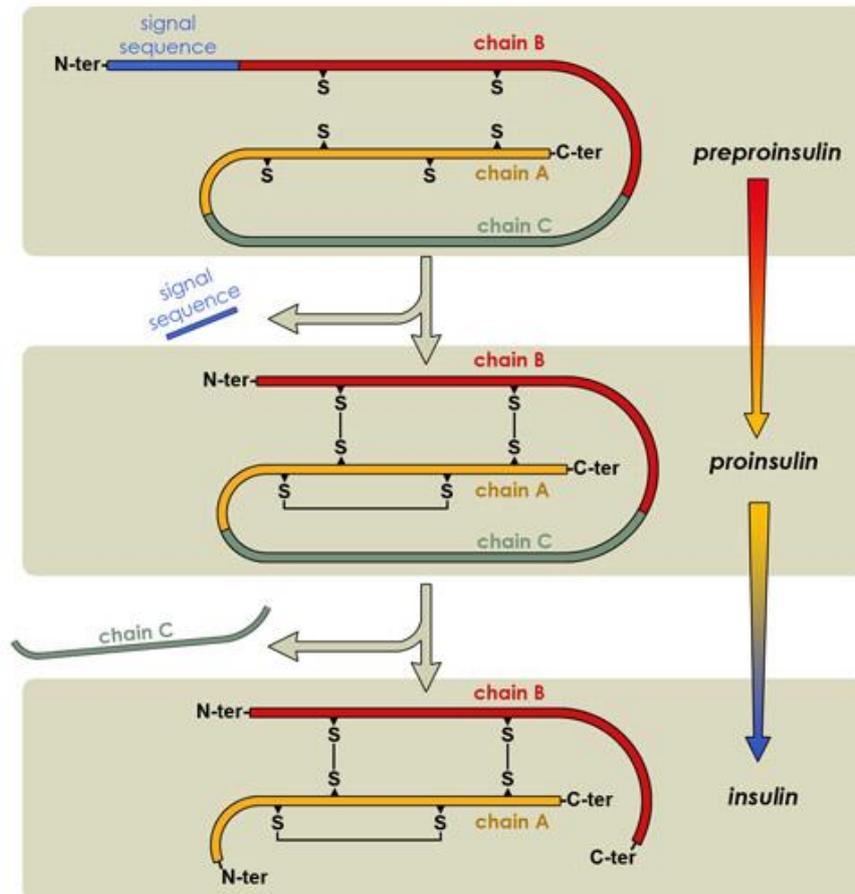


Figure 15 : Schéma de la production d'insuline dans la cellule β

D'après beta cell biology consortium

La libération de l'insuline nécessite ensuite la mise en route du processus d'exocytose des vésicules sécrétoires. Le contrôle de la sécrétion de l'hormone fait appel à une boucle élémentaire de régulation qui lie la concentration des nutriments, en premier lieu le glucose, à la sécrétion d'insuline (Figure 16). En effet, le glucose sanguin, en excès, va entrer dans la cellule β via le transporteur GLUT-1, entrainer l'activation de la glucokinase et ainsi l'augmentation de l'ATP (adénosine triphosphate) intracellulaire, à l'origine de la fermeture du canal potassique ATP-dépendant. Ceci va induire une dépolarisation de la membrane des cellules β et l'afflux d'ions calcium. L'insuline va alors être libérée par exocytose, c'est-à-dire par fusion des granules matures avec la paroi cellulaire, et passer dans la circulation générale.

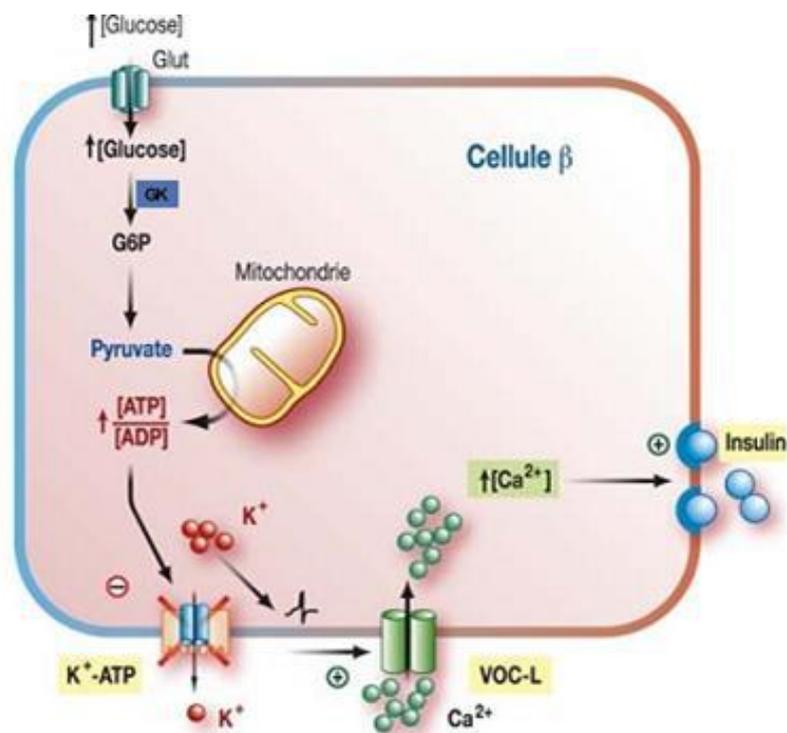


Figure 16 : Mécanisme d'exocytose de l'insuline par la cellule β

D'après <http://insulator.wixsite.com/odysee-insuline/secretion>

2.4.1.4 Le rôle de l'insuline

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante du corps qui a pour rôle d'orienter l'utilisation métabolique du glucose vers la glycolyse (50 %), la glycogénogenèse (40 %) et la synthèse des acides gras (10 %). Elle possède pour cela trois cibles d'action qui sont les cellules musculaires, hépatiques et enfin adipeuses (Figure 17) possédant le récepteur de l'insuline (Figure 17).

En se fixant sur son récepteur, l'insuline active le domaine tyrosine kinase du récepteur à l'origine d'une cascade de réactions qui va notamment amener à la translocation des vésicules de stockage de GLUT-4. En effet, GLUT-4 est un transporteur de glucose qui, dans une cellule non stimulée ou quand la concentration en insuline est faible, est stocké dans des vésicules cytoplasmiques principalement au niveau des cellules hépatiques et musculaires. L'insuline va induire le mouvement des vésicules et leur fusion au niveau de la membrane plasmique. La concentration de ce transporteur insulino-dépendant dans la membrane va alors augmenter (Figure 18).

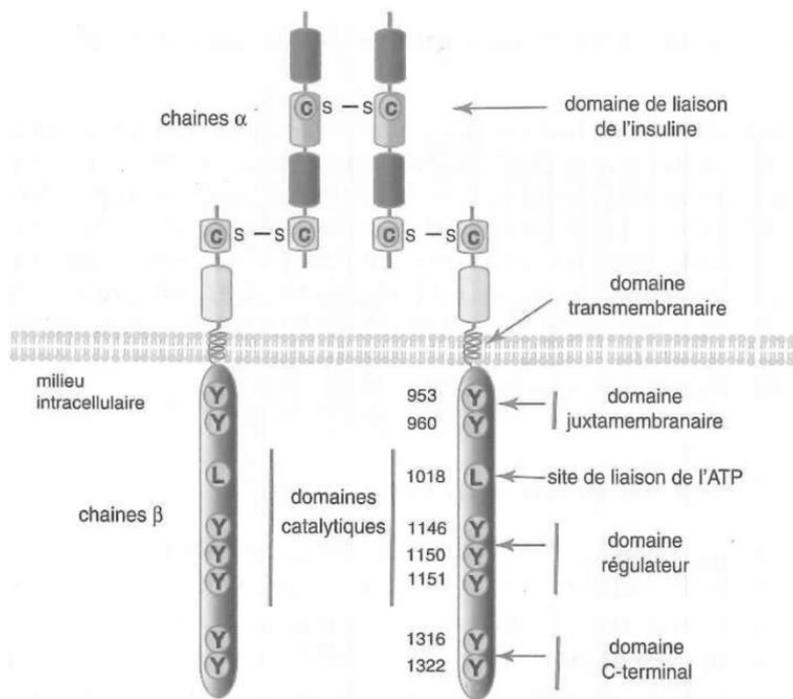


Figure 17 : Récepteur de l'insuline

Plus en détails, en l'absence d'insuline, le glucose ne peut pas rentrer dans la cellule et le transporteur GLUT-4 est sous forme inactive. En revanche, dans le cas où l'insuline se lie sur son récepteur, la fusion des vésicules avec la membrane plasmique se déclenche, le glucose va alors pouvoir rentrer dans la cellule par diffusion passive (Figure 18). Une fois dans les cellules, le glucose est rapidement phosphorylé par des enzymes, la glucokinase dans le foie et l'hexokinase dans les autres tissus, pour former du glucose-6-phosphate qui va alimenter la glycolyse (utilisation du glucose comme source d'énergie) ou va être polymérisé en glycogène, la forme de stockage du glucose.

Tous ces mécanismes sont propres à chaque site d'action de l'insuline (Wilcox et al., 2004).

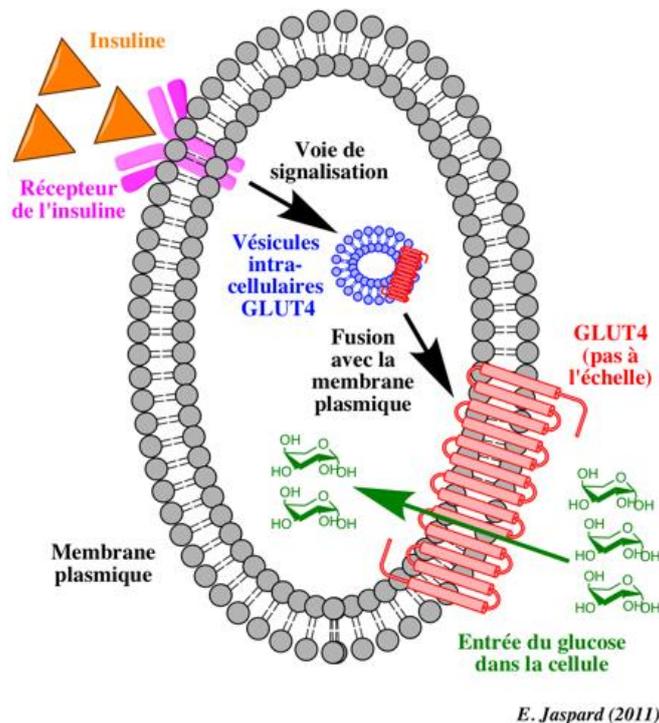


Figure 18 : Mécanisme d'entrée du glucose par le transporteur GLUT-4

D'après <http://biochimej.univ-angers.fr>

Plus en détails, l'insuline utilise ce mécanisme afin de jouer un rôle spécifique au niveau de chacune de ses cibles :

2.4.1.5 Dans le foie

L'insuline accélère la glycolyse (catabolisme du glucose) en induisant la synthèse des enzymes (GK, PFK1, ET PK) ainsi que la glycogénogenèse c'est-à-dire le stockage du glucose sous forme de glycogène. De plus, l'insuline freine la glycogénolyse et la néoglucogenèse qui correspond à la fabrication de glucose par exemple à l'aide d'acides aminés.

2.4.1.6 Dans les muscles et le myocarde

L'insuline a pour rôle l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et du myocarde où elle va accélérer la glycolyse, la glycogénogenèse et freine la glycogénolyse.

2.4.1.7 Dans le tissu adipeux

L'insuline accélère la glycolyse et l'entrée de glucose grâce au transporteur GLUT-4 principalement. La capacité de stockage énergétique sous forme glucidique étant limitée, l'énergie des glucides en excès, une fois les besoins de l'organisme comblés, est mise en réserve sous forme d'acides gras dans le foie et le tissu adipeux. Elle favorise la captation des triglycérides en augmentant l'activité de la lipoprotéine lipase.

2.4.1.8 Le diabète

2.4.1.8.1 Définition et chiffres

D'après la définition de l'OMS, le diabète est « une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit ». Il est caractérisé par un taux de glucose élevé dans le sang ou encore appelé hyperglycémie.

En 2014, 8,5 % de la population adulte (18 ans et plus) était diabétique. En 2015, le diabète a été la cause directe de 1,6 million de décès et en 2012 l'hyperglycémie avait causé 2,2 millions de décès supplémentaires. Cette maladie touche actuellement dans le monde 422 millions de personnes (OMS 2014) dont 46 % de cas non diagnostiqués (Figure 19). L'OMS qualifie le phénomène de véritable pandémie, de par sa progression considérable. Ainsi, les prévisions font état de 622 millions de diabétiques d'ici 2040.

Il existe deux types de diabète majoritaires : le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant et le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant. Un autre type de diabète est également couramment rencontré, le diabète gestationnel.

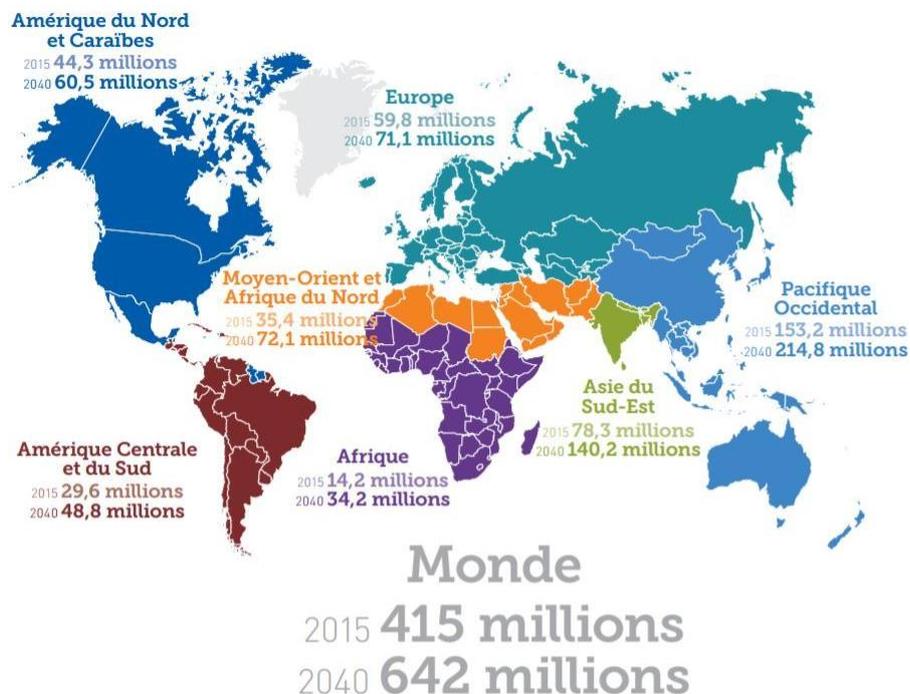


Figure 19 : Chiffres du diabète dans le monde en 2015 et 2040 (20-79ans)

D'après International Diabetes Fundation (IDF)

2.4.1.8.2 Le diabète gestationnel

Selon l’OMS, le diabète gestationnel est défini comme un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse (Alfadhli, 2015). Mais derrière ce terme se cachent deux populations diabétiques différentes que sont les femmes qui ont un diabète méconnu et que la grossesse va révéler et les femmes qui développent un diabète uniquement à l’occasion de la grossesse disparaissant le plus souvent après la grossesse. Ce diabète survient dans un contexte où la grossesse est par nature diabétogène. En effet, au cours de la grossesse, il existe physiologiquement un état d’insulino-résistance qui peut s’aggraver progressivement au cours de la grossesse se transformant en diabète gestationnel.

Ce risque est d’autant plus important pour une grossesse tardive, en cas d’obésité, s’il existe des antécédents de diabète gestationnel ou encore des antécédents familiaux de diabète de type 2.

La prévalence du diabète gestationnel est difficile à évaluer car très variable selon les pays et les origines ethniques. Selon les chiffres de 2016, par exemple la Norvège avait une prévalence de 22,3 % contre 11,6 % pour la France. Mais la tendance actuelle est à l’augmentation dans tous les pays.

Les traitements du diabète gestationnel sont en première intention, la mise en place de mesures hygiéno-diététiques. En seconde intention, la prise d’antidiabétiques oraux et enfin d’une insulinothérapie en troisième intention.

2.4.1.8.3 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) touche environ 10 % des diabétiques et apparaît chez l’enfant ou l’adolescent. Il résulte d’une déficience absolue ou presque du taux d’insuline circulante. Ce type de diabète est principalement dû à une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques, cellules qui sécrètent l’insuline. L’hyperglycémie apparaît lorsqu’il ne reste que 10 à 20 % des cellules β . Le DT1 a un caractère génétique mais cette prédisposition génétique n’est pas seule responsable de l’apparition de la maladie qui reste encore assez floue. Certaines études parlent d’infections virales où le nombre d’infections par entérovirus chez un individu diabétique de type 1 serait plus important. D’autres études ont montré une

relation entre la carence en vitamine D et l'apparition du DT1. Enfin une autre hypothèse fait référence au lait de vache qui réduirait le nombre d'anticorps et serait relié à l'apparition d'un DT1 (Chia *et al.*, 2017).

Le principal traitement du diabète de type 1 est l'apport d'insuline exogène afin de compenser l'insuffisance de sécrétion endogène. Mais d'autres approches thérapeutiques visant à remplacer la fonction insulino-sécrétoire ont été développées pour les patients subissant de nombreux épisodes d'hyperglycémies et d'hypoglycémies comme la transplantation de pancréas ou bien d'îlots pancréatiques.

2.4.1.8.4 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) appelé aussi diabète gras représente la majorité du problème de santé publique puisqu'il concerne 90 % des personnes atteintes de diabète avec plus de cent cinquante millions d'individus touchés dans le monde. Le DT2 est directement associé à l'obésité dont il est une conséquence. Il touche principalement des personnes obèses et survient en général à un âge avancé, après 40 ans même si une tendance à l'apparition au plus jeune âge est en forte augmentation (D'Adamo *et al.*, 2011). Ce diabète est classiquement caractérisé par une altération de la réponse insulinaire au glucose associée à une déficience de la fonction de l'insuline sur les tissus périphériques (muscles et tissu adipeux) et sur le foie appelée insulino-résistance. Initialement, pour compenser la résistance à l'insuline, le pancréas se met à produire davantage d'insuline : il s'agit de l'insulino-résistance. Cependant, avec le temps, le pancréas s'épuise et la sécrétion d'insuline diminue. Il y a donc un manque relatif d'insuline ce qui entraîne une élévation continue de la glycémie. L'apport d'insuline exogène est alors nécessaire. Le diabète est alors dit insulino-requérant.

L'insulino-résistance caractéristique du DT2 peut avoir pour origine un problème survenant directement au niveau du récepteur à l'insuline ou bien un problème en aval de la voie de signalisation. En effet, l'hyper-insulinémie persistante chez les sujets diabétiques de type 2 provoque non seulement une régulation négative du nombre de récepteurs à l'insuline, mais aussi une diminution de leur activité via une sous-activation de la tyrosine kinase. Par ailleurs, on observe également une diminution de l'activité et du nombre de transporteurs de glucose comme GLUT-4 qui notamment accroît encore plus les phénomènes d'insulino-résistance. Les diabétiques de type 2 présentent donc une boucle de régulation de la glycémie altérée et qui

auto-amplifie le problème. Des dépôts amyloïdes sont également retrouvés dans les îlots pancréatiques, provoquant la désensibilisation des cellules β au glucose et perturbant le relargage d'insuline.

Les traitements du DT2 peuvent à la fois être préventifs par la mise en place de mesures hygiéno-diététiques en première intention mais aussi curatifs par la prise d'antidiabétiques oraux en seconde intention et/ou d'une insulinothérapie en troisième intention dans le cas d'un diabète de type 2 insulino-requérant.

2.4.1.9 L'insulinothérapie

2.4.1.9.1 Sécrétion physiologique et niveau d'insuline.

La sécrétion physiologique de l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans est définie par deux types de sécrétion : la sécrétion basale, sécrétée normalement en continu par le pancréas qui correspond à 0,5 UI/kg/J et la sécrétion à la demande (élévation de la glycémie par le repas) pour réguler la glycémie lors d'un apport supplémentaire en sucre allant de 0,3 à 0,5 UI/ kg/J ce qui correspond à une sécrétion totale journalière d'insuline de 0,8 à 1 UI/ kg/J.

2.4.1.9.2 L'apport d'insuline exogène

2.4.1.9.2.1 *Les différents types d'insuline*

Afin de mimer au mieux cette sécrétion physiologique d'insuline, l'insulinothérapie consiste donc en des injections pluriquotidiennes de différents types d'insuline (Tableau 2) alternant insuline lente ou intermédiaire pour l'apport basal et insuline rapide (ou ultra-rapide) pour l'apport d'insuline bolus, postprandiale (Figure 20).

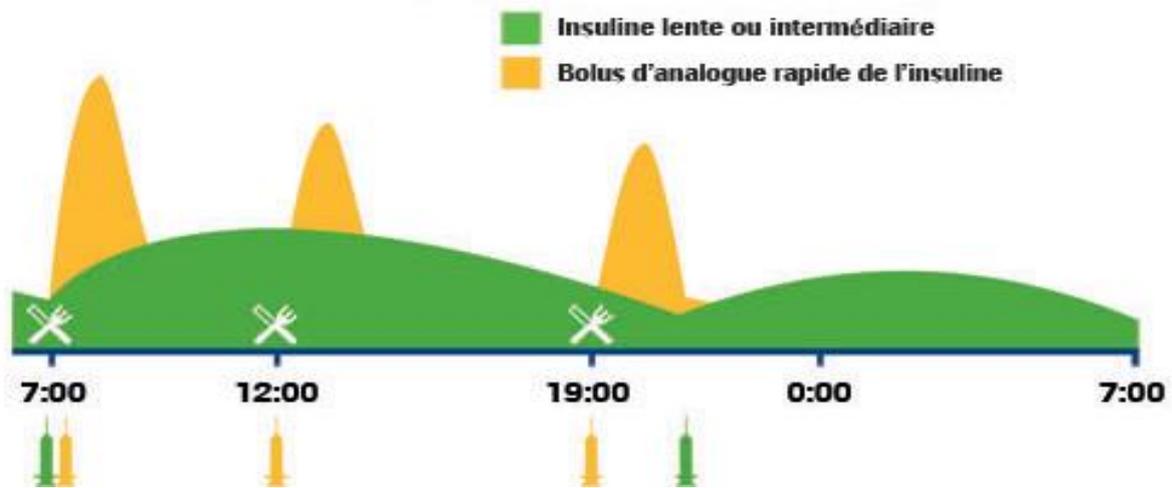


Figure 20 : Exemple d'un schéma de thérapie insulinique

D'après www.ordoscopie.fr

Afin d'obtenir ces différentes durées d'action allant de l'insuline ultralente à l'insuline ultrarapide, la structure chimique des insulines peut être modifiée (figure 21) : par exemple, dans l'insuline Lispro (Humalog® Lilly), deux acides aminés (lysine et proline) de la chaîne β de l'insuline ont été inversés par rapport à l'insuline humaine ce qui confèrent des propriétés d'insuline à action « lente ».

La rapidité d'action peut également être modulée par l'ajout d'excipients (protamine, zinc) ou d'autres acides aminés permettant un relargage plus ou moins rapide de l'insuline dans le sang (Figure 21).

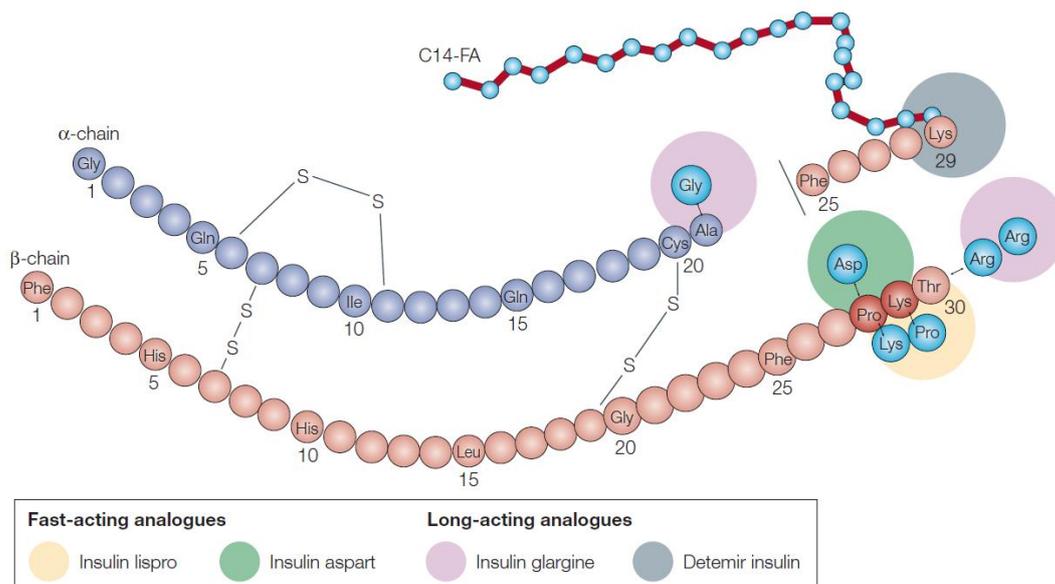


Figure 21 : Modifications chimiques de l'insuline pour obtenir des analogues à vitesse d'action variable

D'après (Owens, 2002)

En 2006, une autre insuline rapide a vu le jour avec le remplacement d'un groupement asparagine en position B3 par une lysine et la lysine B29 remplacée par un acide glutamique. Plus récemment (2012), une insuline ultra lente, la degludec conjuguée avec un groupement d'acide hexadecanedioïque via la gamma-L-glutamyl sur la lysine en position B29, possède une action jusqu'à 42 heures.

Ainsi, ils existent aujourd'hui plus de 180 références d'insulines commerciales dans le monde allant de l'insuline ultra rapide à l'insuline ultra lente (Tableau 2) qui peuvent être administrées à l'aide de différents dispositifs.

Type d'insuline	Composition	Début d'action	Durée d'action	Administration	Exemples
Ultrarapide	Analogues de l'insuline Modifiées de façon à accélérer leur solubilisation et leur absorption	10 à 20 min	3 à 5 h	Avant le repas Efficaces pour les hyperglycémies post-prandiales Ne couvrent pas la période inter-prandiale (association avec une insuline basale obligatoire) Pour pompes SC Voie IV possible	NovoRapid® Insuline ultra-rapide Humalog® Apidra®
Rapide	Insuline solubilisée Insuline humaine	30 min	7 à 9 h	15 à 20 min avant repas ou pompes externes et implantables (mimer débit basal) Voie IV possible	Insuman® Rapid Insuman® Infusat Actrapid® HM
Mixte	Insuline solubilisée + intermédiaire	30 min à 1h	12 à 19 h	30 à 45 minutes avant repas en SC	Insuman® Comb 25
	Analogue insuline ultra-rapide + intermédiaire	10 à 20 min 15 à 45 min 15 à 30min	24h 8 à 24h 7 à 16h	Au repas en SC	Novomix® 30 Humalog® mix 25 Humalog® mix 50
Intermédiaire (NPH =Neutral Protamine Hagedorn)	Protamine + zinc	1 h à 1h30	14 à 24 h	1 à 2x/j en SC au repas	Ryzodeg
				Insulatard®: soit au moment, soit indépendamment des repas en SC Huminsulin® Basal : 2x/j en SC, 30 à 45 min avant les repas matin et soir Insuman® Basal: 45 à 60 min avant les repas en SC	Insulatard®HM Huminsulin® Basal Insuman® Basal
Lente	Analogue de l'insuline	1 à 2 h (Absence de pic d'action)	24h 24-30h	1x/j en SC toujours à la même heure	Lantus® Abasaglar®
			20-24h	1 à 2/j en SC	Levemir®
Ultra-lente	Analogue de l'insuline Dépôt pour ralentir l'absorption	2 h (Absence de pic d'action)	42 h	Administration 1x/j en SC n'importe quand mais tous les jours au même moment	Tresiba®
Ultra-lente combinée (+GLP-1)	Analogue de l'insuline Dépôt pour ralentir l'absorption	2 h (Absence de pic d'action)	42 h	Administration 1x/j en SC à n'importe quel moment de la journée	Xultophy®

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'insuline administrés

2.4.1.9.2.2 Les modes d'administration de l'insuline

❖ Les stylos à insuline

Souvent de format et d'apparence semblable à un crayon feutre, les stylos-injecteurs d'insuline sont munis d'une cartouche contenant l'insuline et permettent une injection en toute autonomie pour le patient diabétique afin de délivrer l'insuline par voie sous-cutanée. Ces stylos sont de plus en plus populaires car très faciles d'utilisation. Il existe deux types de stylos, les stylos réutilisables ou les stylos jetables. Les stylos-injecteurs jetables sont plus pratiques car il n'est pas nécessaire d'y insérer une cartouche d'insuline. Toutefois, leur coût est plus élevé (Figure 22).



Figure 22 : Stylos à insuline à cartouche ou jetable

L'avantage de ces stylos-injecteurs réside dans le fait qu'ils soient faciles à transporter, discrets et pratiques. De plus, ils permettent un dosage précis ainsi qu'un contrôle de la profondeur d'injection afin d'éviter les injections intramusculaires.

En revanche, les injections restent douloureuses et ne permettent pas forcément de réaliser tous les mélanges possibles d'insuline comme vu dans le tableau 2.

❖ Les pompes à insuline

La pompe à insuline est une alternative aux multi-injections à l'aide de stylos depuis 30 ans. Elle permet d'améliorer l'équilibre glycémique par une diminution des hyperglycémies. Elle peut être soit externe (injection sous-cutanée) ou implantée (délivrance intrapéritonéale).

Son fonctionnement est assez simple mais nécessite une formation. La pompe externe a pour principe de délivrer en continu de petites quantités d'insuline rapide tout au long de la journée afin d'être au plus proche de ce qui se passe physiologiquement, notamment grâce à une programmation de son utilisateur et un dispositif de perfusion (cathéter et tubulure) (Figure 23).



Figure 23 : Pompe à insuline portable

De plus, la pompe permet de délivrer une dose d'insuline bolus au moment des repas ou bien de corriger un épisode hypoglycémique.

Comme pour un traitement par multi-injections, la surveillance des glycémies (quatre à six fois par jour) est très importante car le corps n'a aucune réserve d'insuline. Le moindre problème de pompe ou de cathéter peut engendrer une hyperglycémie. Pour éliminer ces risques, les pompes sont équipées d'alarmes spécifiques en cas d'éventuelles anomalies ou dysfonctionnement.

La pompe implantable

Le principal avantage de la pompe implantable est la délivrance d'insuline par voie intrapéritonéale qui permet une absorption rapide et régulière de l'insuline tout en respectant un premier passage hépatique donnant une cinétique plus physiologique et plus reproductible à long terme comparée à la voie sous-cutanée. De nombreuses études cliniques ont démontré que cette voie d'administration permettait d'augmenter l'équilibre glycémique mais également de réduire les épisodes d'hypoglycémies (Almalki *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014) (Figure 24).



Figure 24 : Pompe à insuline implantable

Le système de perfusion est une micro-pompe pulsatile asservie électroniquement, dont le débit est réglé par télécommande externe transmettant des ondes radio à l'antenne de la pompe à travers la peau. La pompe est implantée sous le tissu cutané de l'abdomen des patients et le cathéter délivre l'insuline directement dans le péritoine. Au vu des réductions des fluctuations glycémiques, cette pompe s'adresse uniquement à des patients ayant de sévères hypoglycémies et de grandes variabilités. Mais ce dispositif commercialisé entre autre par Medtronic, a rencontré un faible succès malgré son faible coût et une chirurgie peu invasive. Le dispositif MiniMed® a donc été retiré progressivement du marché avec l'arrêt de sa commercialisation en 2017 dû au faible nombre de patients équipés, environ 500 en Europe.

❖ Le pancréas artificiel

Ce dispositif est composé d'une part d'un capteur sous-cutané donnant la glycémie toutes les cinq minutes ainsi que d'une pompe perfusant de l'insuline via un cathéter par voie sous-cutanée. Même si le MiniMed® 670G ajuste automatiquement le niveau d'insuline, en revanche lors des repas, il faut informer le dispositif des glucides consommés pour que la quantité d'insuline à administrer soit calculée. Il ne permet également pas un contrôle parfait des hypoglycémies sévères (Figure 25).



Figure 25: Système MiniMed® 670G

De plus, ce dispositif n'est pas adressé à tous les patients diabétiques car déconseillé aux patients ayant besoin de moins de 8 unités par jour et uniquement chez l'adulte. Aucun dispositif de pancréas artificiel n'est actuellement commercialisé en France. En revanche, en 2017, aux Etats-Unis, une première commercialisation du système MiniMed® a eu lieu.

Malgré les progrès réalisés dans l'insulinothérapie, environ 70 % des patients diabétiques restent mal contrôlés et le taux d'adhésion serait seulement de 63 % chez le diabétique de type 2 (Farsaei *et al.*, 2014).

Dans cette optique, l'insuline est donc un candidat de choix pour un changement de voie d'administration.

2.4.2 L'héparine par voie orale

2.4.2.1 Pourquoi ?

L'héparine est un glycosaminoglycane naturellement sécrété par l'organisme et est administrée de façon exogène comme traitement anticoagulant par voie injectable.

Au vu des traitements hépariniques mis en place aujourd'hui, de nombreux effets indésirables dus aux injections, comme la douleur ainsi que le manque d'autonomie dû à une intervention médicale à domicile pour certains sujets augmentant les coûts du traitement font de l'héparine un bio-médicament candidat pour une administration par voie orale. De plus, le marché de l'héparine est aujourd'hui en plein essor.

2.4.2.2 Le marché de l'héparine

On estime à 3,1 millions le nombre de sujets ayant reçu au moins un anticoagulant en France au cours de l'année 2013 (contre 2,6 millions en 2011). Le marché de l'héparine plus spécifiquement, a représenté 8,6 milliards d'euros contre 3,9 milliards en 2009 traduisant un marché en pleine expansion avec en moyenne, plus de 500 millions de doses chaque année dans le monde. Pour le futur, les chiffres parlent même de 12,3 milliards pour 2023.

Du point de vue des remboursements au niveau national, 2,76 % de la population sont couverts par le régime général.

Ce marché se dispute entre plusieurs leaders dont le laboratoire Français Sanofi grâce à son héparine de bas poids moléculaire (HBPM), le Lovenox[®], son deuxième médicament le plus vendu dans le monde.

2.4.2.3 La maladie thromboembolique veineuse

2.4.2.3.1 Définition et chiffres

Deux formes de maladies thromboemboliques veineuses (MVTE) existent, il s'agit de la thrombose veineuse profonde (TVP) et de l'embolie pulmonaire (EP), sa complication

majeure. La thrombose veineuse profonde se déclare par un caillot au niveau d'une veine profonde de la jambe.

Selon les chiffres, la MVTE est la troisième cause de mortalité dans les pays développés et la première cause évitable de décès à l'hôpital. Une personne sur quatre décède à cause d'un problème en lien avec un caillot sanguin.

En France, près de 150 000 nouveaux cas sont décelés chaque année, responsables d'environ 15 000 décès.

La MVTE dépend fortement de l'âge (Figure 26). En effet, elle est très rare avant 20 ans et son risque d'apparition après 75 ans augmente de façon significative.

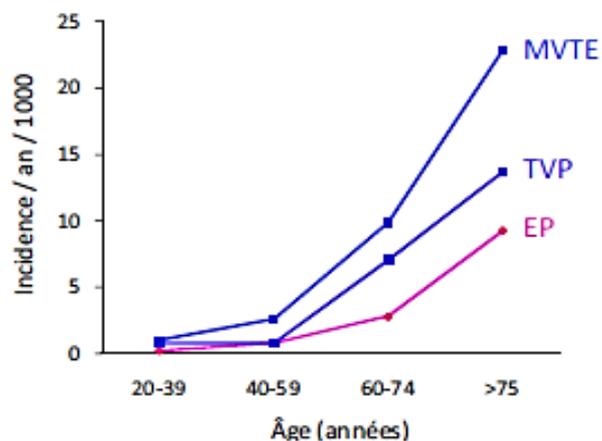


Figure 26: Impact de l'âge sur l'apparition de la MVTE

D'après www.thrombosiscare.be

2.4.2.3.2 Physiopathologie de la thrombose veineuse profonde

Plus en détails, la thrombose veineuse profonde est donc définie comme l'oblitération complète ou partielle d'une veine profonde par un thrombus appelé « caillot » résultant d'une coagulation intravasculaire localisée. Ce thrombus se forme dans des veines drainées par les systèmes caves, la plupart du temps dans les membres inférieurs car plus facilement immobilisés, souvent au niveau des veines du mollet dans des nids vasculaires.

Selon la triade de Virchow, trois facteurs principaux induisent la thrombose veineuse profonde que sont l'altération de la paroi veineuse (altération pariétale) qui reste tout de même un facteur mineur sauf dans le cas de cathéter veineux centraux par exemple. Ensuite, la stase veineuse directement liée à un alitement ou à une immobilisation prolongée ou bien à une insuffisance veineuse chronique ou une compression extrinsèque.

Enfin la troisième cause qui semble majoritaire est l'activation des facteurs de la coagulation favorisée par les traumatismes, l'accouchement ou une chirurgie par exemple.

Sous l'influence d'un ou plusieurs de ces facteurs, le thrombus se forme et peut après décrochage de la paroi aboutir à une embolie pulmonaire. Une seconde complication est l'adhésion du thrombus à la paroi entraînant une obstruction de la lumière vasculaire aboutissant à des œdèmes et au syndrome post thrombotique.

2.4.2.3.3 Complications de la TVP

❖ **L'embolie pulmonaire**

L'embolie pulmonaire est la complication aigüe la plus couramment rencontrée après une thrombose veineuse profonde survenue au niveau du bassin ou des membres inférieurs. Comme dit précédemment, le thrombus se détache de la paroi vasculaire et entre dans les artères pulmonaires où des troubles hémodynamiques ou gazeux se font. Ce caillot obstrue le système circulatoire mais conduit aussi aux augmentations de la résistance vasculaire pulmonaire et de la post-charge ventriculaire droite qui peut aboutir à une insuffisance du ventricule droit ou dans le pire des cas à un arrêt cardiaque.

❖ **Le syndrome post-thrombotique**

Le syndrome post-thrombotique est la complication tardive d'un épisode aigu de thrombose veineuse profonde (environ 30 à 50 % des patients) (Alatri *et al.*, 2012). Il est principalement dû à l'hypertension veineuse entraînant des facteurs tels que le taux de recanalisation, les récurrences de thromboses, la part de reflux et l'activation de médiateurs de l'inflammation. Des traitements précoces à l'aide d'anticoagulants ainsi que leur poursuite à des doses efficaces réduit fortement l'importance et l'extension des lésions anatomiques dues à ce syndrome.

2.4.2.3.4 Les traitements anticoagulants

2.4.2.3.4.1 *Les anti-vitamines K*

La vitamine K est une vitamine liposoluble apportée par l'alimentation ou synthétisée par la flore intestinale. Chimiquement, elle est dérivée de la naphthoquinone et comporte une chaîne hydrophobe. Il en existe 3 sortes : K1 (d'origine végétale), K2 (origine bactérienne) et K3 (origine synthétique).

La vitamine K joue un rôle dans la transformation post-ribosomale des pro-enzymes de certains facteurs de coagulation dit vitamine K-dépendants : la prothrombine (II), la proconvertine (VII), le facteur de Stuart (X), le facteur antihémophilique B (IX) et les protéines C et S.

Les antivitamines K (AVK) dont les plus connues sont la coumarine, l'acénocoumarol et le phénprocoumone (Hanslik *et al.*, 2004) ont la particularité d'avoir une structure chimique proche de la vitamine K. Cette structure leur permet donc d'entrer en compétition au niveau des sites d'activation enzymatiques de l'époxyde réductase (site de régénération de la vitamine K), bloquant le cycle de la vitamine K et la gamma-carboxylation associée, empêchant la fixation des facteurs de coagulation sur les phospholipides membranaires (Figure 27).

Les AVK diminuent donc successivement le taux de facteurs de coagulation vitamine K dépendant cités précédemment.

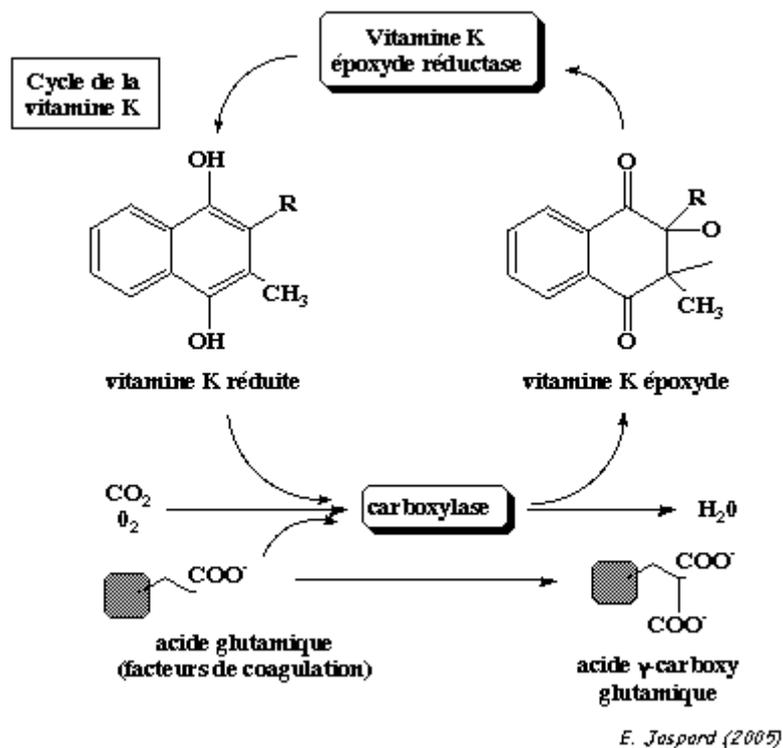


Figure 27 : Cycle de la vitamine K

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Fluindione>

Leur délai d'action est de 24 à 36 heures et peut durer jusqu'à quelques jours après l'arrêt du traitement. Ils sont administrés par voie orale, voie recherchée pour une future administration d'héparine mais possèdent l'inconvénient d'interagir à la fois avec d'autres traitements mais

surtout avec l'alimentation. En effet, la consommation de certains aliments peut fortement augmenter l'apport en vitamine K et ainsi inhiber l'effet des AVK.

2.4.2.3.4.2 Les nouveaux anticoagulants oraux (NAO)

Les anticoagulants oraux directs ont pour rôle d'inhiber de façon directe, réversible et spécifique les facteurs de la coagulation activés que sont le facteur IIa et Xa. En fait, la première classe de NAO a une action directe sur la thrombine comme par exemple les hirudines ou l'argatroban. La seconde classe agit quant à elle directement sur le facteur Xa sans effet sur la thrombine comme le rivaxaban ou l'apixaban.

Leur action est directe et donc sans délai contrairement aux antivitamines K et sont tout comme eux administrés par voie orale.

Leur principal inconvénient provient de leur faible biodisponibilité pour certains due à une métabolisation hépatique et à leur configuration de substrat de la glycoprotéine P, présente au niveau de la barrière intestinale. De plus, ils possèdent comme les AVK des interactions médicamenteuses avec des nombreux immunosuppresseurs ou encore des antiarythmiques (Delavenne, 2013).

2.4.2.3.4.3 L'héparine

L'héparine est un anticoagulant d'origine naturelle découverte il y a plus de 100 ans, en 1916. Sa structure est un polysaccharide dont elle représente l'un des membres les plus complexes. Il en existe deux types : l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaires (HBPM) (Petitou *et al.*, 1999a).

L'héparine non fractionnée

L'héparine non fractionnée (HNF) est aujourd'hui exclusivement extraite de l'intestin de porc après l'arrêt de la commercialisation de l'origine bovine due à des contaminations virales. Son poids moléculaire varie de 5000 à 30000 daltons (Da) pour un poids moléculaire moyen de 14000 Da (Baughman *et al.*, 1998) (Figure 28). Sa structure chimique est une répétition d'un motif disaccharidique de base comprenant un acide uronique et une glucosamine partiellement O- et N-sulfonaté ainsi que quelques séquences particulières pentasaccharidiques qui ne représentent que 4 à 5 % de la structure totale (Figure 28). Il en existe ainsi de nombreuses structures. La présence de groupements sulfates provoque une

charge globale qui est très négative (Quaranta *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2010). Son groupement pentasaccharidique (1700 Da) quant à lui est responsable de son effet anticoagulant de par sa liaison à l'antithrombine.

Plus précisément, la fixation à l'antithrombine serait attribuée à une unité de glucosamine présente dans ce pentasaccharide qui est O-sulfonaté en position 3 ce qui est le cas pour 1 glucosamine sur 75 dans l'héparine. En effet, un pentasaccharide formulé a été dépourvu de cette unité et aucune affinité pour l'antithrombine n'a été constatée (Petitou *et al.*, 1999b).

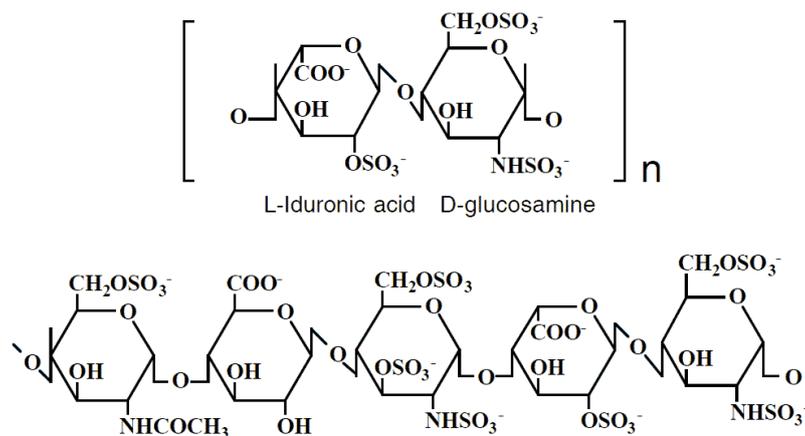


Figure 28 : Structure chimique de l'héparine, exemple d'une unité d'acide uronique et de glucosamine et d'un groupement pentasaccharidique

❖ Action biologique de l'HNF

Son action principale concerne donc ses interactions avec l'antithrombine (AT). En effet, l'héparine permet de potentialiser de l'ordre de 1000 fois l'activité de l'AT, serpine qui a pour fonction d'inhiber la cascade de la coagulation grâce à l'inhibition de la plupart des protéases à sérine (facteurs de coagulation) (Baughman *et al.*, 1998).

L'interaction entre l'héparine et l'AT se réalise en deux étapes : la première est la création d'un pont liant l'héparine aux sites lysine et arginine de l'AT ainsi qu'à la protéase de la coagulation (thrombine) (Figure 29).

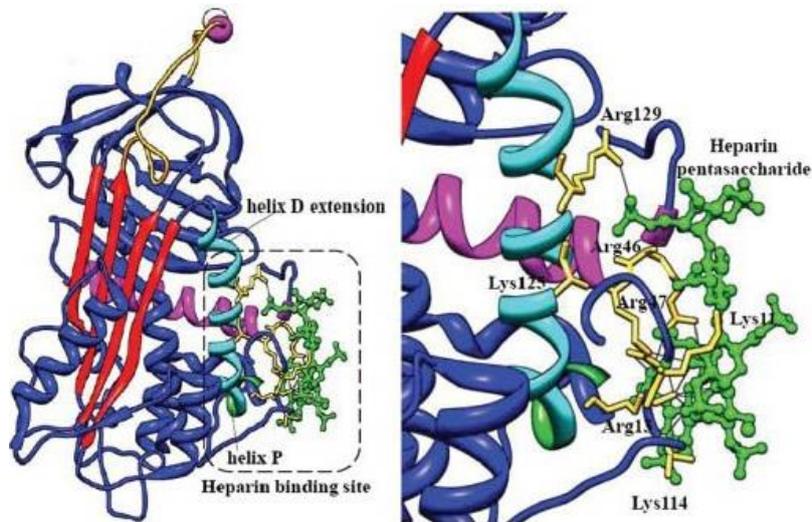


Figure 29 : Sites de fixation de l'héparine à l'antithrombine

D'après (Rashid et al., 2014)

Après fixation, un changement conformationnel du site actif de l'AT se produit ce qui potentialise son activité inhibitrice vis-à-vis de la protéase cible (thrombine) en formant un complexe. Ce complexe expose ensuite le site actif de l'AT qui peut alors se lier de façon non spécifique aux différentes protéases de la coagulation (Facteurs IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa) et inhiber leur action (Hirsh et al., 2001). Il faut noter que les facteurs IIa et Xa sont les facteurs les plus sensibles à l'inhibition par le complexe tout comme la thrombine qui est 10 fois plus sensible que le facteur Xa (Figure 30).

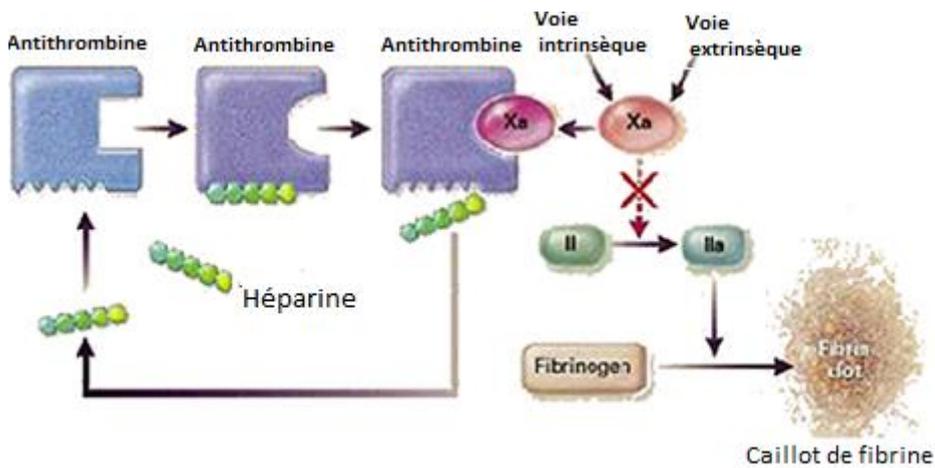


Figure 30 : Mécanisme de fixation de l'héparine à l'antithrombine

D'après <http://m.20-bal.com/buhgalteriya/10165/index.html>(modifiée)

Ce mécanisme est sous forme de cycle car l'héparine n'étant pas catabolisée au cours de la réaction, une fois la thrombine fixée, l'affinité de l'héparine diminue fortement pour son cofacteur et va pouvoir être réutilisée pour une molécule d'AT disponible.

❖ Pharmacocinétique de l'HNF

L'héparine est administrée par voie parentérale sous-cutanée ou intraveineuse. En voie sous-cutanée, la dose doit être augmentée de 10 % pour compenser une plus faible biodisponibilité (Elalamy, 2010). L'HNF a une demi-vie dose-dépendante d'environ 90 minutes en sous-cutanée et de 45 à 60 minutes en intraveineux avec une dégradation hépatique et une élimination urinaire. La clairance plasmatique se fait en deux phases avec une première phase de fixation rapide et saturable sur les protéines plasmatiques, les macrophages et les cellules endothéliales et une seconde phase de décroissance plasmatique plus lente.

❖ Traitement à l'HNF

Pour un traitement à l'HNF, deux schémas thérapeutiques sont envisageables : un traitement préventif avec des doses administrées faibles ou un traitement curatif avec de fortes posologies. Pour la prévention des thromboses veineuses profondes, l'administration d'héparine se fait après tout acte chirurgical. Il est préconisé une injection standard de 5000 UI d'HNF par voie sous-cutanée deux heures avant l'intervention puis trois fois par jour pendant 7 jours après l'intervention.

Dans le traitement curatif, l'héparine sera utilisée pour le traitement des TVP, des embolies pulmonaires ou des thromboses artérielles de préférence par voie intraveineuse et en continu. Par exemple, une dose charge de 100 UI/kg puis 500 UI/kg/24h en ajustant la posologie si nécessaire.

Les héparines de bas poids moléculaires

Les héparines de bas poids moléculaires sont de plus en plus utilisées car elles présentent trois avantages sur les HNF : elles permettent de réduire l'activité du facteur IIa et ainsi d'augmenter l'activité du facteur Xa, elles présentent également un rapport bénéfice/risque meilleur que l'HNF. De plus, elles possèdent une meilleure biodisponibilité (90 % vs 30 % pour HNF).

Les héparines de bas poids moléculaires exceptée le fondaparinux sont obtenues par dépolymérisation chimique soit par une digestion à l'acide nitrique ou une hydrolyse alcaline ou bien par digestion enzymatique par des héparinases à partir des chaînes de l'héparine non fractionnée, mécanisme uniquement utilisé pour la tinzaparine (Elalamy, 2010). De son côté, le fondaparinux est une héparine de synthèse formulé avec un poids moléculaire de 1600 Da. Pour les autres, selon la pharmacopée Européenne, les HBPM possèdent un poids moléculaire moyen inférieur à 8000 Da (3000 à 10000 Da) (Wolf, 1994) et comme pour l'HNF, la structure responsable de la liaison à l'AT est le pentasaccharide. Leur mécanisme d'action est donc identique à celui de l'HNF et dépend de la masse moléculaire des chaînes saccharidiques. En effet, l'héparine doit avoir un poids moléculaire supérieur à 5400 Da pour que l'antithrombine fixe le facteur IIa. les chaînes ayant une masse moléculaire inférieure à 5400 Da auront donc une activité essentiellement anti-Xa (Figure 31).

Pour l'HNF en revanche, son activité anti thrombine (IIa) et anti facteur de Stuart (Xa) sont équivalentes (rapport anti-Xa/anti-IIa=1) (Hirsh *et al.*, 2001).

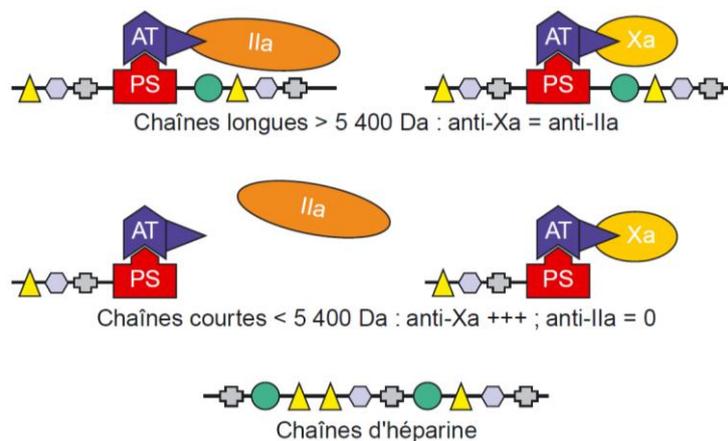


Figure 31 : Mécanisme d'action et activité anti IIa/anti Xa de l'héparine (PS=polysaccharide) selon sa longueur de chaîne

D'après (Elalamy, 2010)

Comme dit précédemment, selon les HBPM, la méthode de préparation est différente leur conférant des rapports anti-Xa/anti-IIa propre à chacune (Figure 32 et 33).

Procedure	LMWH	Average Molecular Weight	Trade Names
Oxidative depolymerisation with hydrogen peroxide	Ardeparin	5500	Normiflo [®]
Deaminative cleavage with isoamyl nitrite	Certoparin	5400	Sandoparin [®]
Benzoylation followed by alkaline hydrolysis	Enoxaparin	4500	Lovenox [®] and Clexane [®]
Oxidative depolymerisation with Cu ²⁺ and hydrogen peroxide	Parnaparin	5000	Fluxum [®]
Heparinase digestion	Tinzaparin	6500	Innohep [®] and Logiparin [®]
Deaminative cleavage with nitrous acid	Nadroparin	4300	Fraxiparin [®]
Nitrous acid deaminative cleavage	Dalteparin	5000	Fragmin [®]
Nitrous acid depolymerization, purification through chromatography	Reviparin	4400	Clivarin [®]
β -elimination, and fractionation	Bemiparin	3600	Ivor [®]

Figure 32 : Méthodes de préparation des différentes héparines

D'après (Akhtar et al., 2018)

	Poids moléculaire moyen (Da)	Rapport anti-Xa/anti-IIa
Héparine non fractionnée	15 000	1
<i>HBPM</i>		
Tinzaparine (Innohep [®])	6 800	1,6
Parnaparine (Fluxum [®])	3 700	2,3
Certoparine (Sandoparine [®])	3 100	2,4
Daltéparine (Fragmine [®])	5 600	2,5
Nadroparine (Fraxiparine [®])	3 600	3,3
Énoxaparine (Lovenox [®])	3 200	3,9
Réviparine (Clivarine [®])	3 600	4,2
Bémiparine (Hibor [®])	2 900	9,6
Fondaparinux (Arixtra [®])	1 700	Infini

Figure 33 : Poids moléculaire et rapport anti-Xa/anti IIa des différentes héparines

D'après (Elalamy, 2010)

❖ Pharmacocinétique des HBPM

Les HBPM se fixent peu ou pas aux protéines plasmatiques, aux macrophages ou aux cellules endothéliales contrairement à l'HNF. Leur élimination étant essentiellement rénale, un risque important d'accumulation en cas d'insuffisance rénale existe. Leur biodisponibilité par voie sous-cutanée est proche de 100 % réduisant le nombre d'injections. La clairance étant indépendante de la dose, l'activité anticoagulante semble plus sûre et plus prédictible ce qui en explique le contexte de supplantation de l'HNF au profit des HBPM.

❖ Traitement aux HBPM

Les HBPM sont principalement utilisées à l'heure actuelle dans le cadre préventif de la maladie thromboembolique dont trois sont efficaces : la fraxiparine, l'énoxaparine et la fragmine à une dose de 1750 à 4000 UI selon le risque thrombogène pendant une durée minimum de 6 jours. Aujourd'hui l'utilisation des HBPM tend à s'étendre à un traitement curatif des TVP et de l'embolie pulmonaire mais les posologies exactes ne sont pas encore bien définies et les études cliniques sont en cours (Elalamy, 2010).

L'insuline ou l'héparine ont des structures et des propriétés bien spécifiques les confrontant ainsi aux multiples barrières d'une administration par voie orale. Afin de pallier ces obstacles, des solutions existent.

2.5 Stratégies pour pallier aux différentes barrières de la voie orale

2.5.1 Modifications chimiques des molécules

Dans le cas de l'insuline, des greffages ont été réalisés avec du polyéthylène glycol (PEG) donnant son nom à la technique de pegylation dans le but de diminuer la clairance de l'insuline et d'éliminer l'immunogénéité.

La technologie Nobex utilise la pegylation de l'insuline appelée HIM2 avec un greffage situé sur le groupement amine de la lysine 29 de la chaîne bêta de l'insuline. Cette technologie a montré une augmentation de la solubilité, de l'absorption et de la stabilité contre les enzymes mais 5 % de biodisponibilité seulement ont été observés (Clement *et al.*, 2004; Clement *et al.*, 2002) (Figure 33)

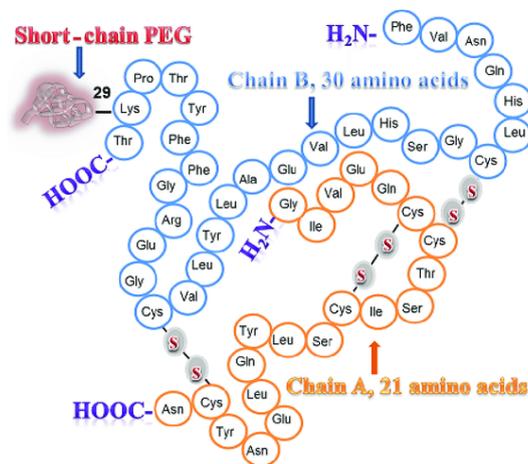


Figure 34 : Greffage du PEG sur le groupement lysine de l'insuline

D'après (Gedawy *et al.*, 2018)

Une autre stratégie basée sur la modification chimique est celle provenant de Emisphere's Eligen qui a créé des liaisons covalentes entre l'insuline et des molécules de faible poids moléculaire (200-400 Da) de nature lipophile afin d'augmenter la lipophilie de l'insuline et ainsi augmenter le passage de l'épithélium intestinal. Mais cette technologie n'a pourtant montré qu'une biodisponibilité insuffisante (Iyer *et al.*, 2010).

Pour l'héparine, cette même stratégie a été testée. Par exemple, le deoxycholic acid (DOCA) a été utilisé pour augmenter sa biodisponibilité mais a montré des effets toxiques par l'utilisation de certains solvants comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Kim *et al.*, 2007). D'autres acides gras ont été utilisés comme l'acide palmitique, l'acide laurique ou le cholestérol mais ont montré des effets plus faibles que le DOCA sur le temps de coagulation (Lee *et al.*, 2000).

2.5.2 Amplificateurs d'absorption

Cette technique est utilisée dans le but d'augmenter l'absorption au niveau du tractus gastro-intestinal par des mécanismes transcellulaires (augmenter la lipophilie) ou paracellulaires (ouverture des jonctions).

Pour les deux principes actifs, les acides biliaires, certains surfactants, la toxine *zollera occludens* (ZOT) ou encore certains acides gras ont été utilisés comme amplificateurs d'absorption. Malgré des résultats *in vivo* parfois encourageants, de nombreux effets toxiques ont été reportés de par leur mécanisme d'action : perturbateur de la couche muqueuse, ouverture des jonctions, laissant entrer certains parasites.

Une autre molécule particulièrement étudiée est le SNAC (sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino] caprylate) utilisée en combinaison avec l'insuline et l'héparine afin d'augmenter l'absorption intestinale par simple diffusion à travers l'épithélium ce qui réduit la potentielle toxicité (Baughman *et al.*, 1998; Berkowitz *et al.*, 2003).

Pour l'héparine, malgré des résultats cliniques intéressants, une faible adhérence a été observée due au goût désagréable de la molécule.

Pour l'insuline, cette technologie appelée dans ce cas Eligen®, développée par Emisphere technologies n'a montré à ce jour aucune efficacité en clinique même à haute dose ce qui augmente fortement les coûts du traitement.

2.5.3 Muco-adhésion

De nombreux polymères ayant des propriétés muco-adhésives ont été exploités afin de prolonger le temps de résidence des principes actifs au niveau du site absorption c'est-à-dire l'épithélium intestinal. C'est le cas par exemple de l'alginate, du chitosan ou encore de l'acide polyacrylique. En supplément, des groupements thiomers peuvent y être ajoutés afin d'augmenter jusqu'à 140 fois leur pouvoir mucoadhésif (Bernkop-Schnurch, 2005).

De plus, le chitosan possède la capacité d'ouvrir les jonctions serrées de l'épithélium par un mécanisme d'interaction avec les protéines présentes dans les jonctions serrées ou bien un récepteur de surface (Fan *et al.*, 2016).

Ce mécanisme est également présent avec l'utilisation de chélateur de calcium qui active des protéines kinases et qui perturbe à la fois les jonctions serrées et les jonctions d'adhérences. Une autre technique est l'utilisation de polymère permettant la pénétration du mucus comme le N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA).

Pour l'héparine, de nombreuses études utilisent le chitosan ou un de ses dérivés et ont montré une pénétration par une ouverture des jonctions serrées (mécanisme paracellulaire) (Lai *et al.*, 2014; Thanou *et al.*, 2001a, b).

Comme pour l'insuline, des polymères thiolés ont également été étudiés et ont montré une augmentation significative de l'absorption intestinale *in vivo* et une biodisponibilité de 20 %.

Malgré une certaine efficacité, toutes ces stratégies ne permettent pas de protection ni gastrique ni intestinale des bio-médicaments d'intérêt. En revanche, l'encapsulation permet à la fois de combiner ces stratégies d'absorption mais également d'apporter une protection à ces molécules. Pour cela, différents systèmes d'encapsulation ont été développés.

2.5.4 Les systèmes d'encapsulation

2.5.4.1 Les microparticules

Les microparticules sont constituées d'un enrobage de nature lipidique ou polymérique et renferment un principe actif. Leur taille varie de 1 à 1000 µm. Deux structures de microparticules existent : les microsphères et les microcapsules (Figure 34).

Les microsphères sont constituées d'une matrice continue de polymère ou de lipide dans laquelle le principe actif est dispersé. En revanche, dans les microcapsules, le principe actif est

sous forme liquide, solide ou gazeux au cœur de la microcapsule entourée d'une membrane de matériaux enrobant.

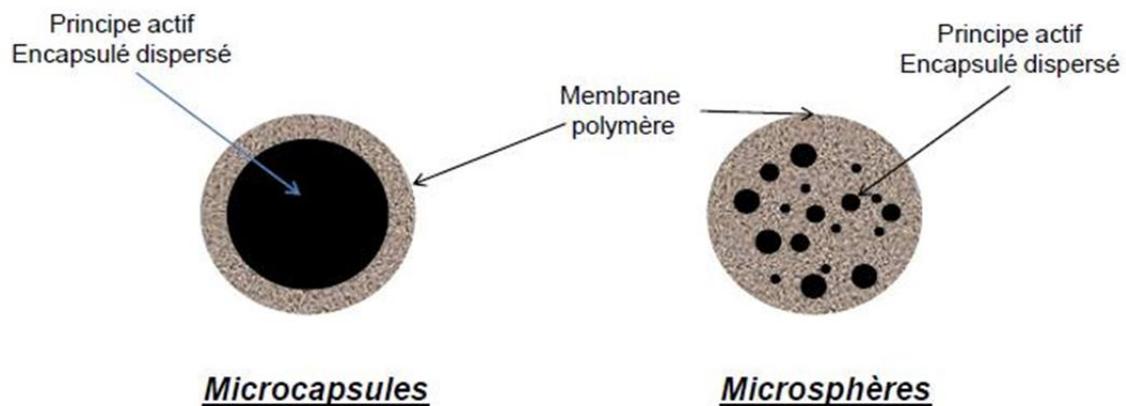


Figure 35 : Structure des microcapsules vs microsphères

D'après /www.userisadmin.byethost7.com

Cette membrane peut être de nature polymérique d'origine naturelle comme le chitosan, l'alginate ou la gélatine ou bien synthétique comme l'acide polylactique (PLA) ou l'acide polylactique co-glycolique (PLGA), deux polymères biocompatibles.

De nombreuses études utilisent les systèmes de microparticules pour encapsuler l'insuline et l'héparine. Par exemple, Jiao et al développent des microparticules d'héparine à base de différents polymères synthétiques comme le PLGA ou le Polycaprolactone (PCL) (Jiao *et al.*, 2002). De même, Hinds et al ont encapsulé de l'insuline dans des microparticules pegylées à base de PLGA également (Hinds *et al.*, 2005).

Des microparticules sont également utilisées pour encapsuler de l'insuline co-précipitée avec des lipoprotéines (Xing *et al.*, 2018).

2.5.4.2 Les liposomes

Les liposomes sont des systèmes d'encapsulation composés d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux. Cette bicouche est composée de phospholipides ou de sphingolipides (moins courant), molécules avec une tête polaire et une queue apolaire qui forment naturellement des liposomes dans un milieu aqueux. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche non accessible à l'eau et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (Figure 35). Cette structure est refermée sur elle-même en une vésicule, qui isole un compartiment interne

aqueux. Leur diamètre peut varier de 20 nm à quelques micromètres, selon la méthode de formulation utilisée. En effet, ils peuvent être de type multi, oligo ou unilamellaires.

L'avantage des liposomes réside dans leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. En effet, la plupart des phospholipides entrant dans la composition des liposomes sont de type glycérophospholipides d'origine naturelle mais aussi parfois des lipides de types cationiques ou sensibles au pH.

Les méthodes de formulation font appel à des techniques de dissolution dans un solvant organique, de réhydratation de film ou d'évaporation de solvant par exemple.

Dans la littérature, l'héparine a été encapsulée dans des liposomes cationiques à base de phosphatidylcholine (Bai, 2010).

L'insuline quant à elle a été encapsulée dans des liposomes depuis bien longtemps. Dès 1985, Sprangler utilisait déjà cette forme d'encapsulation pour administrer l'insuline par voie orale (Sprangler). Degin *et al* aussi ont formulé des liposomes multilamellaires à base de cholestérol (Degin *et al.*, 2006).

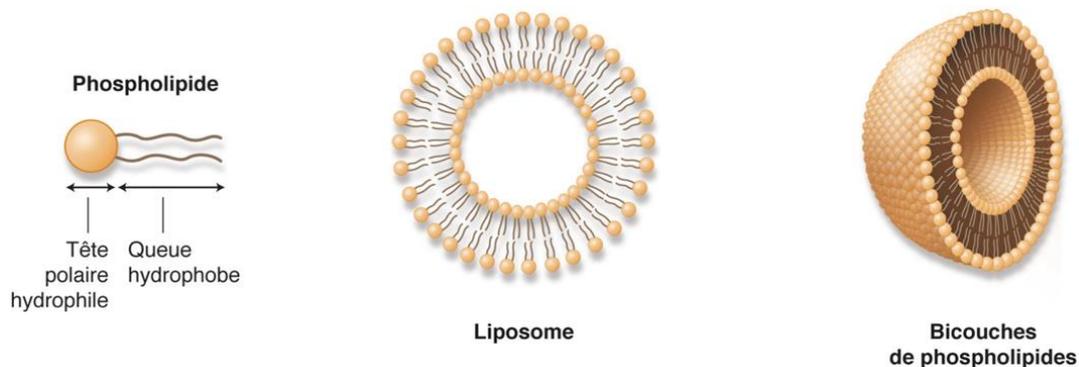


Figure 36 : Structure d'un liposome

D'après <http://www.em-consulte.com>

2.5.4.3 Les micelles

Une micelle est un agrégat sphérique de molécules de petite taille allant de 1 à 50 nm et dont la tête polaire chargée est tournée vers le solvant et la queue hydrophobe est tournée vers l'intérieur. Contrairement aux liposomes, les micelles sont composées d'une seule couche lipidique. Des micelles inverses peuvent se former dans des solvants organiques (Figure 36). Les micelles sont particulièrement adaptées pour la formulation de principes actifs hydrophobes, elles présentent une grande stabilité et peuvent être formées de polymères biocompatibles.

Les micelles sont des systèmes peu présents dans la littérature pour l'encapsulation de principes actifs. Seules quelques études sur l'encapsulation d'insuline ont été réalisées comme celle de Zang et al. qui ont synthétisé des micelles à base de chitosan modifié (Zhang *et al.*, 2013).

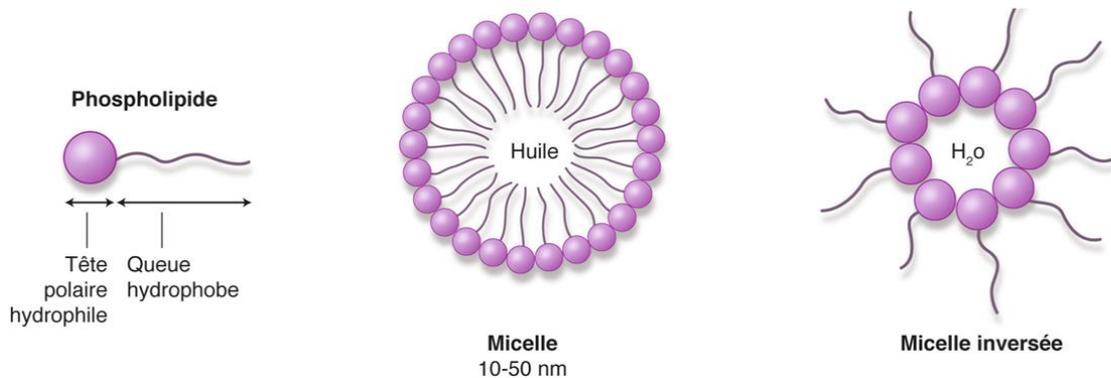


Figure 37 : Structure d'une micelle

D'après <http://www.em-consulte.com>

2.5.4.4 Les nanoparticules

Les nanoparticules en revanche sont très utilisées et possèdent une taille comprise entre 10 et 1000 nm. Elles sont formulées à base de polymères ou encore de lipides et permettent l'emprisonnement ou l'adsorption de principe actif. Il existe différents types de nanoparticules que sont les nano-sphères dont le principe actif est dissous dans la matrice (polymérique ou lipidique). En revanche, si le principe actif est emprisonné dans un cœur liquide, on parlera alors de nano-capsule (Figure 37). Dans les deux cas, le principe actif peut également être absorbé à la surface.

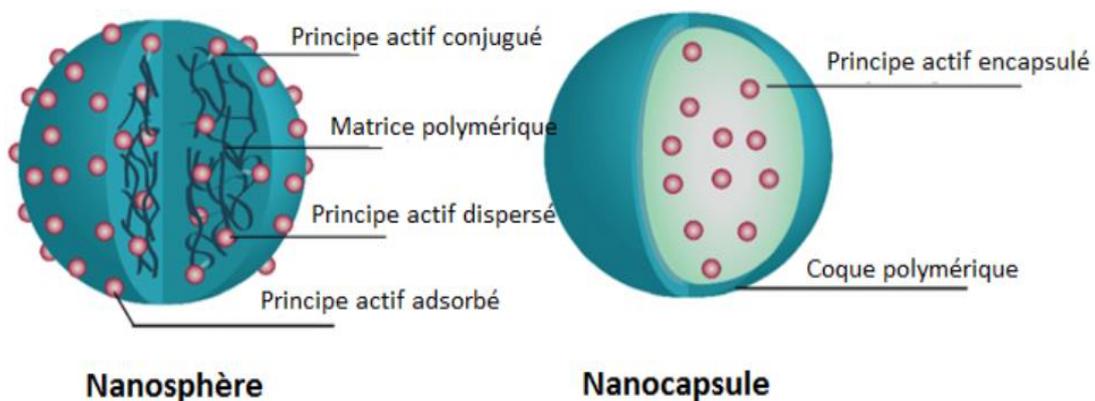


Figure 38 : Comparaison de la structure d'une nanosphère à celle d'une nanocapsule

D'après (Cortes *et al.*, 2017)

2.5.4.4.1 Nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques sont des vecteurs composés d'un principe actif dispersé dans une phase aqueuse contenant un surfactant. Elles possèdent donc généralement un cœur solide hydrophobe contenant le principe actif dissous ou dispersé. Elles peuvent être de nature lipidique solide c'est-à-dire que les lipides constituent la matrice des particules ou être des nano-capsules lipidiques possédant un cœur huileux recouvert d'une paroi rendue rigide par un agent de surface.

L'avantage des nanoparticules lipidiques réside dans leur faible toxicité grâce à la présence de lipides biocompatibles mais également dans leur taille allant de 10 à 200 nm environ et leur mono-dispersité associée leur conférant un avantage pour passer les membranes biologiques et échapper au système immunitaire (Mishra *et al.*, 2013).

Contrairement aux nanoparticules polymériques, les nanoparticules lipidiques sont beaucoup moins utilisées pour l'encapsulation de molécules. Quelques études peuvent être trouvées concernant l'insuline. Par exemple, des nanoparticules lipidiques solides ont été utilisées pour une administration par voie orale d'insuline (Sarmiento *et al.*, 2007).

2.5.4.4.2 Nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques sont apparues dans les années 70 comme une alternative aux liposomes ayant une meilleure stabilité de stockage. Elles peuvent être formulées à l'aide de polymères synthétiques ou naturels. Comme vu précédemment, pour les polymères synthétiques, la plupart des formulations rencontrées se font à base de polymères approuvés par la FDA : le poly-ε-caprolactone, la polylactic acid (PLA), le polyméthyl méthacrylate et le polylactic acid glycolic (PLGA) (Figure 38).

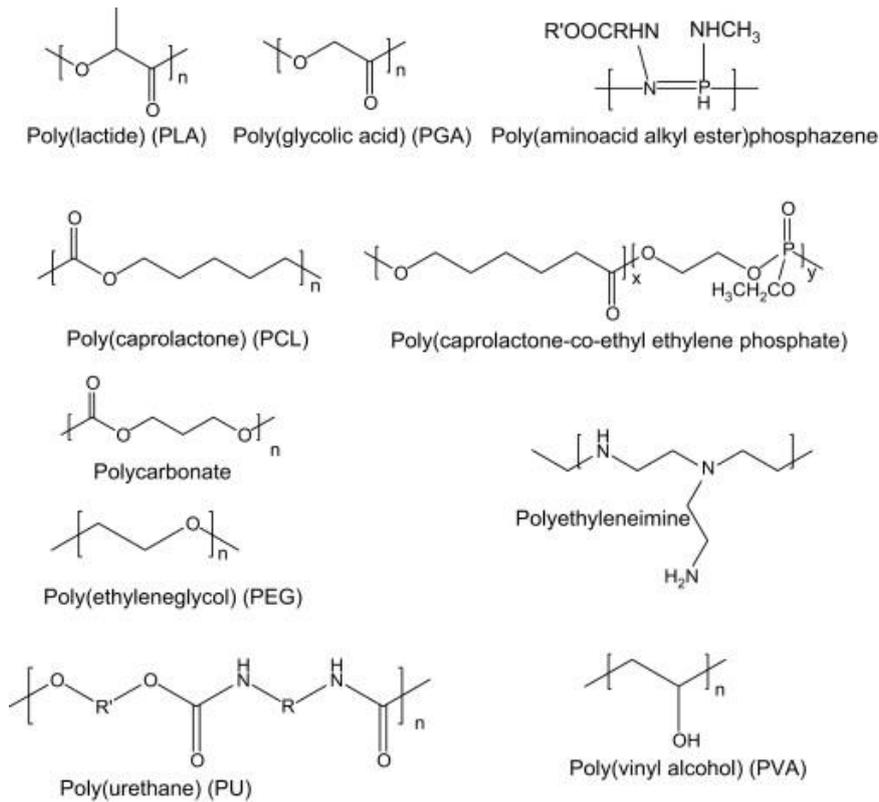


Figure 39 : Structure chimique de polymères synthétiques utilisés dans la formulation de nanoparticules

Le PLGA possède l'avantage de s'hydrolyser en deux monomères que sont l'acide lactique et l'acide glycolique rapidement métabolisés par l'organisme ce qui en fait un polymère biocompatible.

Pour les polymères naturels, les plus souvent rencontrés sont des polysaccharides comme l'alginate, l'acide hyaluronique, le dextran ou encore le chitosan (Figure 39).

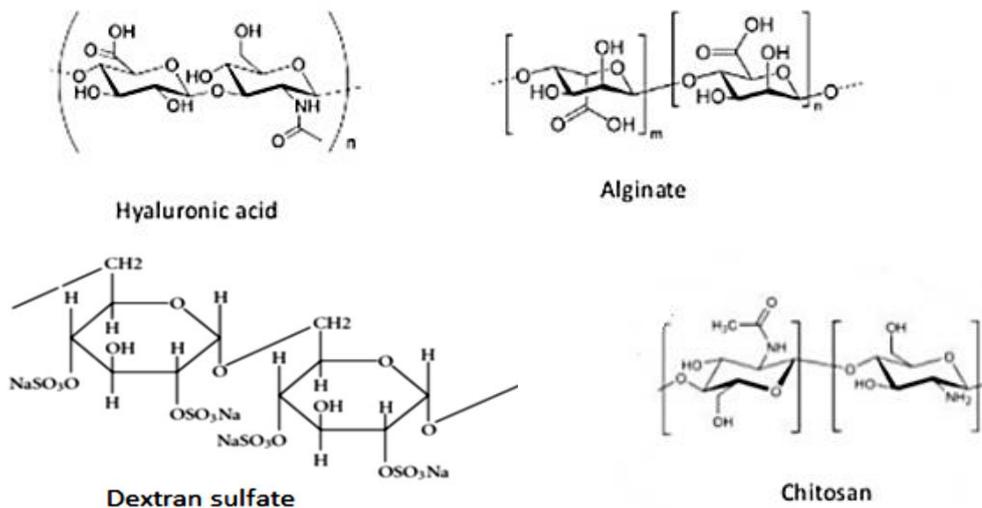


Figure 40 : Structure chimique de polymères d'origine naturelle utilisés dans la formulation de nanoparticules

Les nanoparticules polymériques peuvent être formulées par deux méthodes principales que sont la polymérisation de monomère (émulsion ou dispersion/polymérisation) ou alors la dispersion de polymère (salting out, émulsification-diffusion, nano-précipitation).

2.5.4.4.2.1 Techniques de préparation des NPs polymériques

Polymérisation micellaire

Cette technique permet d'encapsuler des principes actifs hydrophiles et la formulation de nano-sphères ou de nano-capsules. Pour cela, le principe actif est dissous dans une phase aqueuse interne émulsionnée dans une phase organique contenant de fortes quantités de tensio-actifs. On obtient ainsi une émulsion inverse de structure micellaire. Les monomères hydrophiles sont ensuite ajoutés à l'émulsion formée et diffusent vers les micelles. La polymérisation est alors activée par irradiation ou par voie chimique avec un initiateur. Les nanoparticules sont ensuite purifiées par ultracentrifugation ou dialyse. Cette technique possède l'inconvénient d'utiliser de grandes quantités de tensioactifs et de solvant potentiellement toxiques et nécessitant des étapes de purification. De plus, cette technique forme des nanoparticules de polyacrylamides principalement, polymère non biodégradable.

Polymérisation en émulsion

Cette technique de formulation consiste à émulsionner un monomère partiellement (ou non) soluble à l'eau dans une phase aqueuse contenant une quantité importante de tensio-actifs au sein d'une émulsion ou d'une mini-émulsion. Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir des nanosphères mais aussi des nanocapsules grâce à une polymérisation interfaciale ou des réactions de polycondensation dans des émulsions ou dans microémulsions sont réalisées. Jusqu'à présent, seuls quelques monomères se sont avérés appropriés pour produire des nanosphères et des nanocapsules comme par exemple des monomères cyanoacryliques qui polymérisent spontanément au contact d'anions OH^- présents dans le milieu. La vitesse de polymérisation est dépendante du pH et sera très élevée pour un pH élevé. La vitesse influe directement sur la taille des particules (grosse particule pour un pH acide et une faible vitesse).

Le principal inconvénient de cette technique vient de l'acidité du milieu nécessaire pour ralentir la vitesse de polymérisation et ainsi avoir une taille de particule faible pouvant entraîner la dégradation de certains principes actifs. En revanche, elle permet l'encapsulation de nombreux médicaments, lipophiles ou hydrophiles.

Les propriétés de surface peuvent également être ajustées en choisissant la nature de l'agent de stabilisation des polymères servant de revêtement de matériaux et permettant de contrôler le devenir *in vivo* des nanoparticules.

Plus récemment, l'utilisation d'une mini-émulsion a été suggérée comme méthode alternative pour préparer des nanocapsules contenant de l'huile par polymérisation interfaciale d'alkylcyanoacrylate où le monomère est directement dissous dans l'huile (mygliol) et émulsionné dans de l'eau acidifiée à l'aide d'ultrasons afin d'obtenir une dispersion rapide de la phase huileuse. Le pH de la phase aqueuse reste élevé pour stimuler la polymérisation anionique d'alkylcyanoacrylates qui est initiée à l'interface huile/eau (Vauthier *et al.*, 2009).

Préparation par dispersion de polymères

❖ Emulsification-évaporation de solvant

Pour l'émulsion simple, le polymère, le principe actif et les surfactants sont dissous dans une phase organique hydrophobe que l'on émulsionne dans une phase aqueuse à l'aide d'un système d'homogénéisation afin d'obtenir une dispersion. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation formant ainsi les gouttelettes d'émulsion. Cette technique est donc adaptée aux principes actifs lipophiles et la formulation de nano-sphères, ce qui n'est pas adaptable pour l'insuline et les héparines tous deux hydrophiles et pour une administration par voie orale avec un principe actif adsorbé à la surface et donc potentiellement peu protégé (Crucho *et al.*, 2017).

❖ La nano-précipitation

La nano-précipitation peut être utilisée pour la formulation de nano-capsule et de nano-sphères. Elle consiste à dissoudre un principe actif (et une huile pour les nano-capsules) dans une solution organique de polymère dispersée dans un solvant miscible à l'eau. Cette solution est ajoutée à une phase aqueuse contenant un tensio-actif sous agitation modérée dans lequel la phase organique n'est pas soluble. Les nanoparticules se forment sous l'effet de la diffusion du solvant vers la phase aqueuse et le polymère insoluble dans le mélange eau-solvant

précipite sous forme de nano-sphère encapsulant le principe actif. Pour les nano-capsules, le polymère se dépose à l'interface eau-solvant et huile car il est insoluble dans les deux phases. On réalise ensuite une évaporation de solvant (Mishra *et al.*, 2013).

❖ « Salting out »

Cette technique de formulation passe par une étape d'émulsification. Dans un premier temps, le polymère et le principe actif sont dissous dans un solvant organique miscible à l'eau. Une solution aqueuse saturée en électrolytes est ensuite ajoutée pour empêcher la diffusion du solvant. Cette solution contient un stabilisant afin de former une émulsion huile/eau grâce à une agitation forte. L'eau est ensuite ajoutée à l'émulsion afin que le solvant diffuse vers la phase aqueuse et conduise à la formation de nanosphère par agrégation du polymère. Une purification est réalisée ensuite afin d'enlever le sel et le solvant. Cette méthode n'est pas adaptée à nos principes actifs car limitée aux principes actifs lipophiles mais possède l'avantage de permettre un meilleur contrôle de la taille des particules. En revanche, la présence de sel peut être un inconvénient en termes de toxicité et de comptabilité avec les autres constituants. De plus, cette méthode ne permet de formuler que des nano-sphères.

❖ Emulsification-diffusion

La méthode d'émulsion-diffusion est la méthode la plus utilisée pour la formulation de nanoparticules solide-lipide et de nanoparticules polymériques (Mishra *et al.*, 2013). Cette méthode est utilisée comme alternative à la méthode de salting out car elle n'utilise pas d'électrolytes qui sont parfois difficiles à éliminer. La phase organique contient le polymère et le principe actif (et une huile pour la formulation de nano-capsules) dans un solvant saturé. Le mélange est réalisé sous agitation mécanique (rotor-stator par exemple) à une phase aqueuse saturée contenant un stabilisant afin de former une émulsion huile/eau. Une dilution de l'émulsion est ensuite réalisée afin de former les nanoparticules par diffusion de solvant vers la phase aqueuse externe. Enfin, une étape d'évaporation de solvant est nécessaire.

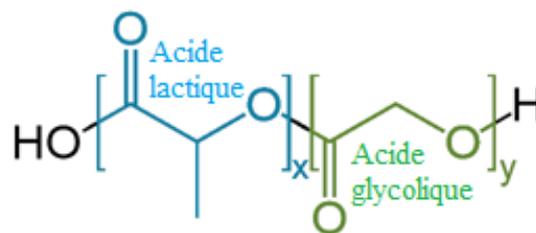
Cette technique permet d'obtenir des nanoparticules d'une taille entre 100 et 1000 nm et permet uniquement l'encapsulation de principes actifs lipophiles sous forme de nano-capsules ou de nano-sphères donc non adaptée à nos molécules d'intérêt.

❖ Double-émulsion-évaporation de solvant

Dans ce procédé de formulation, une première émulsion est réalisée entre le polymère dissous dans la phase organique et un solvant partiellement miscible à l'eau et la phase aqueuse contenant le principe actif (émulsion eau dans huile). La seconde émulsion est ensuite formulée à partir de la première en ajoutant une seconde phase aqueuse contenant un stabilisant. On obtient ainsi la double émulsion (eau/huile/eau) Cette étape est suivie d'une étape d'évaporation de solvant sous agitation formant la « coque » polymérique (Iqbal *et al.*, 2015).

L'avantage majeur de cette technique est qu'elle permet l'encapsulation de divers principes actifs hydrophiles de petites tailles (Bilati *et al.*, 2005). De plus, elle est souvent utilisée avec des polymères d'origine naturelle (figure 40) comme le PLGA, un polymère biocompatible et approuvé par la Food and Drug Administration (FDA). Son utilisation permet de jouer sur la cinétique de dégradation des nanoparticules en contrôlant les paramètres pertinents tels que le poids moléculaire du polymère, le rapport acide lactique/ acide glycolique et la concentration du médicament pour obtenir une dose et un intervalle de relargage souhaité en fonction du type de médicament encapsulé.

Par exemple, le PLGA 50:50, un copolymère d'acide poly lactique (PLA) et d'acide poly glycolique (PGA) (Figure 40) se dégrade plus rapidement dans les milieux biologiques que les autres ratios d'acide lactique et d'acide glycolique (Danhier *et al.*, 2012; Makadia *et al.*, 2011).



X et Y indiquent le nombre de répétitions de chaque unités

Figure 41 : Structure chimique de PLGA

Cependant, ces émulsions nécessitent la présence de solvants et de tensio-actifs qui peuvent s'avérer toxiques. Le choix des solvants doit alors être réfléchi dans le cadre d'une utilisation biologique des NPs. Ces solvants sont également classés par la FDA en plusieurs classes qui délimitent leurs domaines d'utilisation chez l'homme. La quantité de solvant peut également être contrôlée pendant l'évaporation, afin de limiter l'administration clinique de ces solutions.

Pour les tensio-actifs, leur présence reste indispensable à la stabilisation des deux émulsions, réduisant la tension interfaciale entre la phase huileuse et la phase aqueuse grâce à leur structure dont une partie est hydrophile et l'autre lipophile. Ces tensio-actifs peuvent être de nature cationique, anionique, zwitterionique, amphotère ou non-ionique. Les non-ioniques sont des tensio-actifs particulièrement utilisés dans le domaine pharmaceutique de par leur forte propriété stabilisante mais également leur faible toxicité.

Leurs propriétés tensio-actives sont classées en fonction de leur balance hydrophile-lipophile (HLB) c'est-à-dire la proportion de phase hydrophile et de phase lipophile allant de 0 à 20. Plus la valeur est élevée, plus la solubilité dans l'eau est grande. Selon le type d'émulsion voulue (eau dans huile ou huile dans eau), la HLB du tensio-actif devra être prise en compte. Par exemple, pour obtenir une émulsion huile dans eau, il faudra utiliser un tensio-actif dont la HLB est assez grande c'est-à-dire qu'il sera plus hydrophile que lipophile. Certaines huiles sont même définies avec une HLB, définissant leur stabilisation dans une phase aqueuse. Enfin, les HLB peuvent s'additionner dans le cas d'une utilisation multiple de tensio-actifs.

Cette technique a donc été choisie pour encapsuler nos bio-médicaments dans le but de formuler des nanoparticules polymériques composées de PLGA. Ce système d'encapsulation va permettre de protéger en partie nos principes actifs de la dégradation intestinale mais également permettre le passage de l'épithélium et ses barrières associées sans modification des molécules d'intérêt. Cette technologie va donc être utilisée dans un premier temps avec l'insuline en vue d'une transposition à l'héparine par la suite.

En revanche, aucune protection gastrique n'est attribuée aux nanoparticules de PLGA qui se dégradent rapidement en milieu acide. Pour cela, un concept de double encapsulation a vu le jour et a fait l'objet d'un brevet.

2.6 Le brevet concept de la double encapsulation

Le concept de la double encapsulation a fait l'objet d'un brevet déposé en 2005 issu d'un partenariat entre le CEED et le CNRS, plus particulièrement l'institut Charles Sadron (CNRS) (patent CNRS/Ceed: FR 0304976& PCT/FR0400974). Cette double encapsulation est donc décrite avec un premier vecteur à la fois gastro-résistant et entérosoluble et un second vecteur, un système de nanoparticules polymériques contenant le principe actif hydrophile à encapsuler pour une future administration orale (Figure 41).

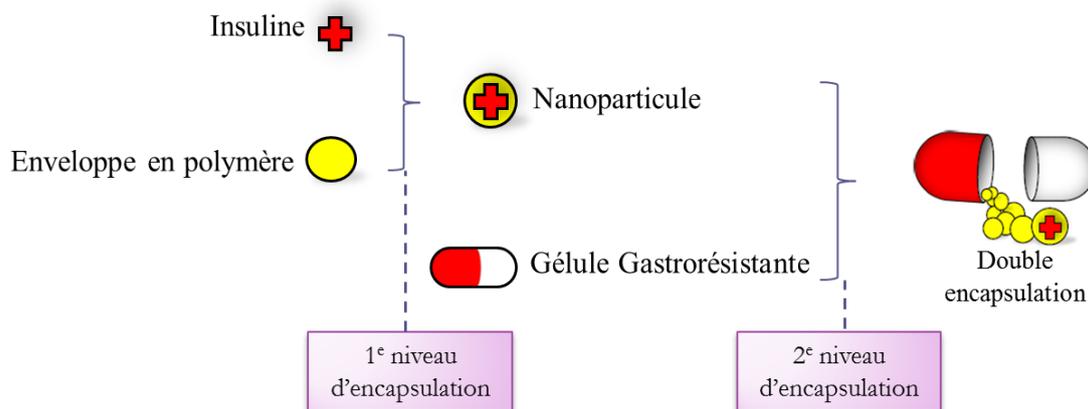


Figure 42 : Concept de la double encapsulation

Le premier vecteur gastrorésistant développé a été l'utilisation d'une gélule gastro-résistante, commercialisée par la société CAPSUGEL et recouverte d'un polymère lui conférant ses propriétés de gastro-résistances. Le second quant à lui a été formulé à base de « billes » d'alginate par la technique de gélation ionotropique.

Ces deux types de vecteurs développés doivent conférer une protection gastrique aux nanoparticules principalement de son pH acide et ses enzymes associées. De plus, cette protection va permettre une libération du second vecteur, les nanoparticules polymériques en milieu intestinal, de par ses propriétés entéro-solubles en se délitant à un pH proche de 7.

Pour le deuxième système d'encapsulation, comme exposé précédemment notre choix s'est tourné vers un système de nanoparticules polymériques contenant le principe actif à encapsuler et composées de PLGA, formulées par la technique de double émulsion/évaporation de solvant.

Ces nanoparticules doivent à la fois protéger le principe actif du milieu intestinal mais également permettre le passage de l'épithélium et ses différentes barrières (mucus, tapis cellulaire). Le but étant d'arriver dans le foie et son premier passage hépatique par la veine porte pour finalement atteindre la circulation sanguine.

Ce système de double encapsulation va donc nous permettre de pallier toutes les barrières existantes au niveau du tractus gastro-intestinal pour l'administration de bio-médicaments d'intérêts tels que l'insuline ou l'héparine.

2.7 Données antérieures du projet

L'administration orale de bio-médicaments à l'aide de ce système de double encapsulation a été mise au point avec l'insuline et a fait l'objet de deux projets : le projet « ORAIL » pour Oral Administration of Insulin et le projet « ORAILBIS ».

Au niveau développement du système de double encapsulation, deux grandes phases ont été nécessaires, l'élaboration du véhicule gastro-résistant et l'élaboration du système nanoparticulaire.

2.7.1 Le véhicule gastro-résistant

Au début du projet, en collaboration avec la société CAPSUGEL, des gélules gastro-résistantes ont été développées appelées PCcaps[®]. Ces gélules pouvaient contenir les nanoparticules sous forme de poudre (lyophilisées).

Pour leur conférer leurs propriétés gastro-résistantes, ces gélules ont été recouvertes d'un polymère, l'Eudragit[®] L100-5 et ont été validées au sein de notre laboratoire en termes de gastro-résistance et d'entéro-solubilité. D'un point de vue méthodologique, les gélules ont été remplies de caféine et ensuite incubées, en milieux gastrique et intestinal simulés préparés selon les recommandations de la pharmacopée Européenne (9.5) (European-Pharmacopoeia-9.5) et fixant des normes bien précises. En effet, la gélule doit être résistante au moins 1 heure en milieu gastrique et libérer au moins 75 % du principe actif en moins d'une heure. Les résultats obtenus avec les gélules remplies de caféine sont présentés dans la figure 42. Ainsi nous avons pu valider une résistance de deux heures en milieu gastrique et une libération de 100 % du principe actif au bout de 30 minutes dans le milieu intestinal.

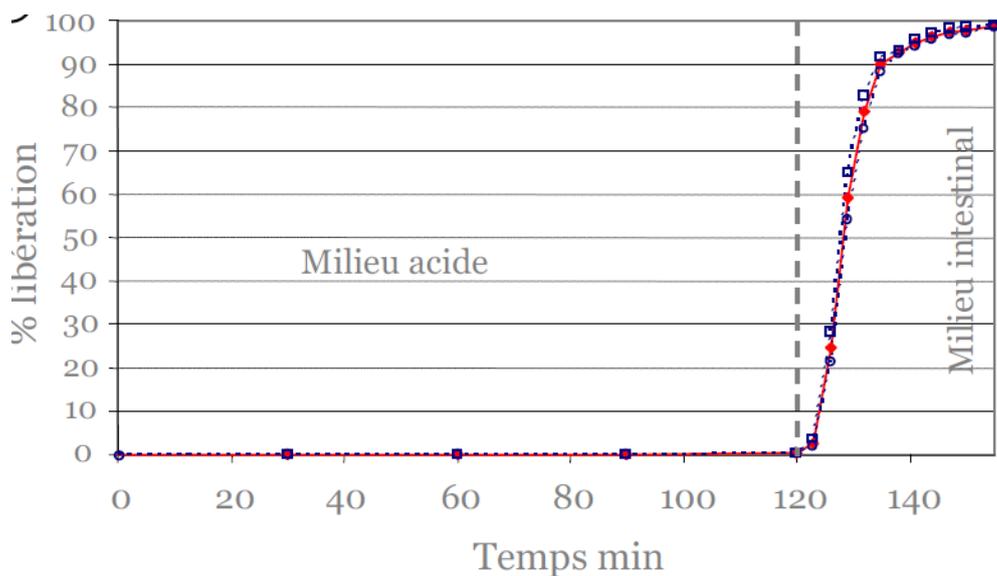


Figure 43 : Cinétique de libération de la caféine contenue dans des gélules PCcaps®

Les gélules ont été incubées successivement dans un milieu gastrique simulé (milieu acide pH=1,2) deux heures puis dans un milieu intestinal simulé, pH=7,2. D'après thèse Nathalie Reix, 2009.

Une fois validées *in vitro*, la suite du projet a consisté à tester *in vivo* ces mêmes gélules afin d'évaluer leur délai de dissolution en conditions physiologiques. Pour cela, les gélules ont été remplies d'un principe actif facilement dosable (le paracétamol) puis administrées par gavage chez le rat. La quantité de paracétamol retrouvée dans le sang des rats a ensuite été dosée. Les résultats sont présentés figure 43.

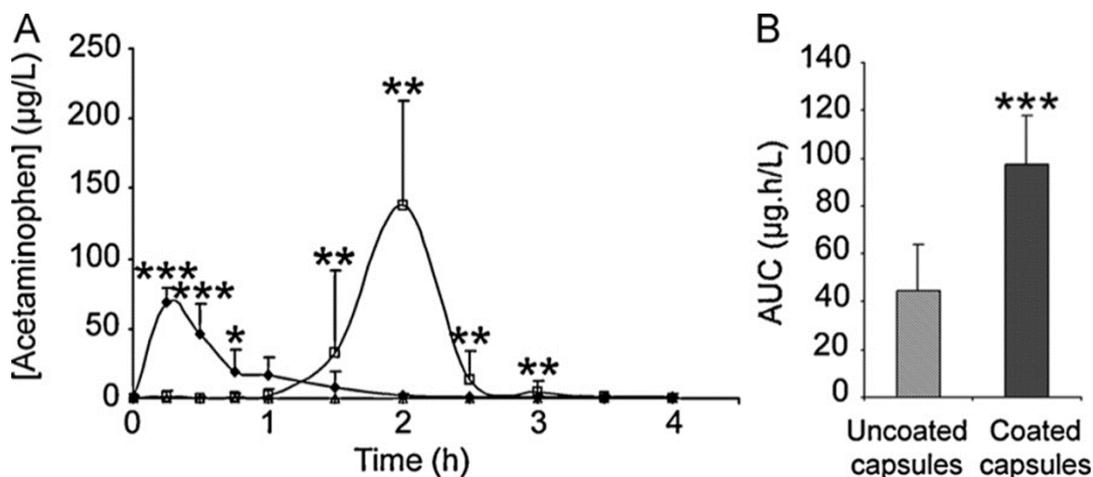


Figure 44 : Concentration de paracétamol dosée dans le plasma de rat

Les gélules ont été administrées par voie orale des gélules PCcaps® enrobées (carré vide) ou non (carré rempli) et aires sous la courbe, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs gélules vides. D'après (Reix et al., 2012a)

Les résultats ont montré une dissolution complète des gélules recouvertes en deux heures pour retrouver la quantité de paracétamol administrée dans le sang des rats. Pour les gélules non recouvertes, une partie du principe actif n'a pas été retrouvée après deux heures.

Par la suite, un second vecteur a été développé à base d'alginate et formulé par gélification ionotropique du polymère. Ainsi, des billes d'alginate de taille micrométrique ont été formulées sous forme liquide, pouvant ainsi être adaptées à des gélules molles contrairement aux gélules dures précédentes (impératifs industriels). Une fois formulées, elles ont été caractérisées par microscopie optique et leur stabilité en milieux simulés gastrique et intestinal a été observée (Figure 44).

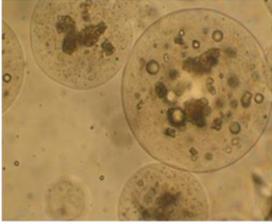
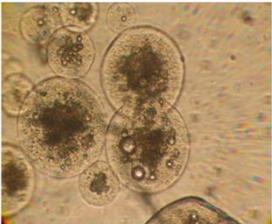
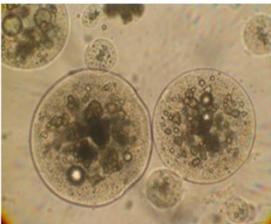
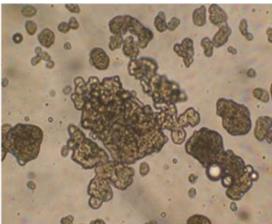
	T = 0 heure	T = 2 heures
Post synthèse		
Milieu gastrique simulé (37°C)		
Milieu intestinal simulé (37°C)		

Figure 45 : Etude de stabilité des véhicules renfermant des nanoparticules

Les véhicules ont été incubés dans les milieux gastrique et intestinal simulés (clichés réalisés au microscope optique X40. D'après thèse Mouhamadou Diop, 2015

Les résultats ont montré une résistance en milieu gastrique pendant deux heures et une libération des nanoparticules immédiatement après incubation en milieu intestinal (Figure 44).

2.7.2 Le système nanoparticulaire

La seconde phase de développement a concerné le second système d'encapsulation c'est-à-dire les nanoparticules de PLGA encapsulant l'insuline. Dans un premier temps, il a fallu mettre au point la formulation de ces NPs par double émulsion évaporation de solvant. Une fois effectuée, des nanoparticules d'une taille de 200 nm, de charge nulle et d'une efficacité d'encapsulation supérieure à 70 % ont été obtenues. Ensuite, ces mêmes nanoparticules ont été testées et validées biologiquement d'un point de vue internalisation au sein d'un modèle de cellules intestinales puis *in vivo* après injection intraduodénale chez le rat diabétique (Reix *et al.*, 2012b). De plus, une réduction de la glycémie des rats diabétiques a été démontrée *in vivo* mais avec une biodisponibilité faible qu'il était nécessaire d'optimiser (biodisponibilité de 10%). C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers les propriétés physicochimiques des NPs dans un but afin d'optimiser leur internalisation et donc leur efficacité.

Pour cela, une première stratégie a consisté à tester différentes tailles de nanoparticules *in vitro* et *in vivo* mais aussi en termes de toxicité et d'efficacité (thèse P. Guhmann). Ainsi, nous avons démontré que sur un panel de NPs de taille variant de 100 à 1000 nm, les NPs avec une taille inférieure ou égale à 400 nm présentaient les meilleures caractéristiques en termes de toxicité et d'internalisation sur les deux modèles *in vitro* de cellules intestinales. Ces NPs ont ensuite été formulées à une échelle semi-industrielle dans le cadre d'une collaboration avec un industriel pharmaceutique, Catalent®. Ainsi ces NPs standards d'une taille de 200 nm ont montré un protocole de formulation facilement transposable à cette échelle et plus reproductible. Ainsi la taille de 200 nm a été validée définitivement.

En revanche, cette collaboration industrielle nous a confrontés aux exigences associées principalement sur la quantité de surfactant utilisée dans notre formulation. Ainsi cette quantité a dû être réduite et a entraîné une modification des propriétés physico-chimiques des nanoparticules faisant ainsi apparaître une charge négative de surface.

Ces nanoparticules, une fois testées *in vitro* ont montré une meilleure internalisation cellulaire que les NPs standards non chargées (Figure 45). Cependant, ces nanoparticules étaient particulièrement instables lors de leur transposition à une échelle semi-industrielle.

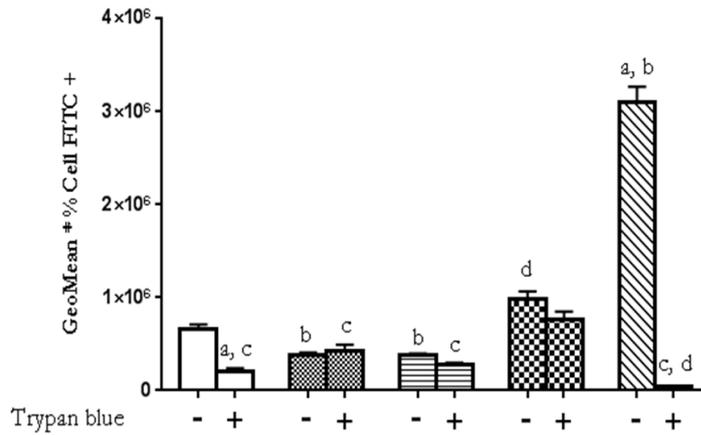


Fig.5: Uptake of insulin loaded PLGA particles on Caco-2 model

Associated fluorescence measurement were performed by flow cytometry, 50000 events were recorded per well and datas were expressed by Geo mean multiplied by the percentage of fluorescent cells per each well N=3 (nine time measurement per N). The pattern (□) represent free FITC labeled insulin, (◻) for + PVA particles, (◻) for - PVA particles, (▨) for PEGylated PLGA particles and (▩) for chitosan coated PLGA particles. Data are presented in mean ± SEM, ANOVA Oneway Tukey was applied to compare all groups ^ap<0,001 vs free FITC labeled insulin, ^bp<0,001 vs - PVA particles, ^cp<0,001 vs quenched - PVA particles and ^dp<0,001 vs chitosan coated PLGA particles.

Figure 46 : Internalisation des nanoparticules selon la charge de surface sur un modèle cellulaire Caco-2.

D'après thèse Mouhamadou Diop, 2015

Pour aller plus loin et confirmer ces premiers résultats, le projet a donc été orienté sur l'étude de l'impact de la charge de surface des NPs *in vitro* et *in vivo*.

Les objectifs de la thèse

3 Objectifs

Ce travail de thèse a été réparti sur deux grandes phases d'optimisation avec comme objectif commun l'encapsulation de deux bio-médicaments : l'insuline et l'héparine.

L'encapsulation de l'insuline, a fait l'objet dans un premier temps d'une étape de validation d'une méthode de quantification de l'insuline par HPLC après une modification majeure de la méthode décrite dans la monographie de la pharmacopée Européenne. Le but étant de pouvoir quantifier l'insuline présente au sein de notre système d'encapsulation.

Toujours sur l'insuline et en parallèle de cette validation de méthode, nos travaux ont consisté à travailler sur l'optimisation de notre système nanoparticulaire pour une future administration orale. Pour cela, une première étude concernant l'impact de la charge de surface des NPs sur leur absorption intestinale au sein d'un modèle *in vitro* mais également l'efficacité *in vivo* ont été réalisées. Mais une faible biodisponibilité due à une perte conséquente d'insuline en milieu intestinal nous a amené vers une seconde étude consistant à élaborer différentes stratégies afin de réduire cette perte de principe actif en conditions intestinales.

Dans un second temps, l'objectif était de transposer le système nanoparticulaire optimisé à l'héparine, afin de le valider d'un point de vue physico-chimique mais également *in vitro* en vue d'une future administration par voie orale *in vivo*.

Matériel et méthode

4 Matériel et méthode

4.1 Insuline et héparine : formulation des NPs et validation *in vitro/in vivo*

4.1.1 Formulation et caractérisation des NPs d'insuline et d'héparine.

4.1.1.1 Préparation des nanoparticules de PLGA

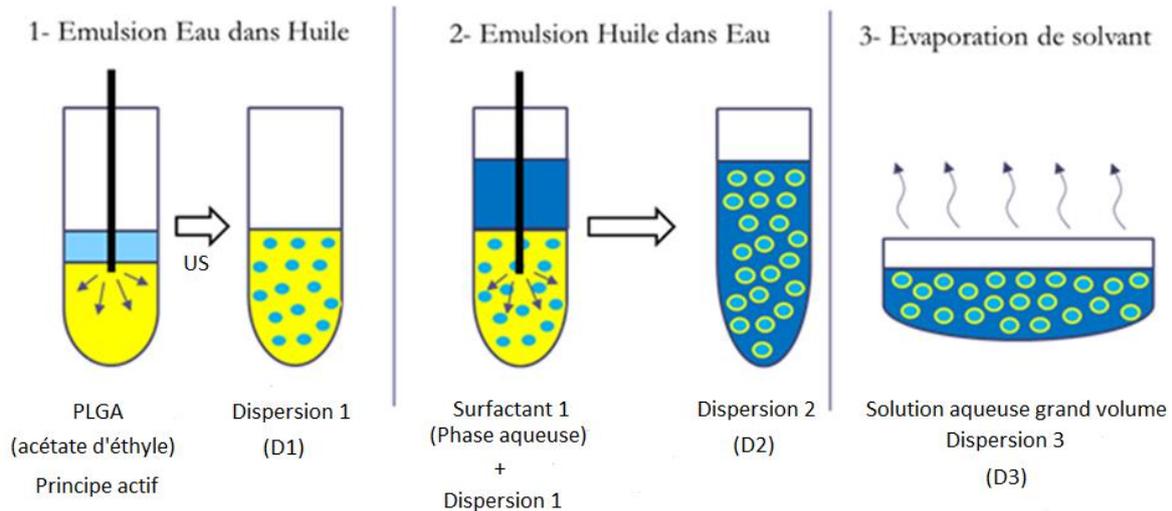


Figure 47 : Protocole de formulation des nanoparticules

Les NPs sont de type polymérique et ont été préparées par la méthode de double émulsion et évaporation de solvant comme décrite précédemment (Reix *et al.*, 2012b) (Figure 46). Le polymère utilisé est un polymère hydrophobe, le PLGA 50:50 Resomer® (RG 502H, M_w 14,000) (Boehringer Ingelheim, Allemagne) et les surfactants utilisés pour les deux émulsions consécutives sont le Pluronic® F68 (BASF Corporation, Mount Olive, NC, Etats-Unis) avec une HLB supérieure à 24 et le second est l'alcool Polyvinylique (PVA 18-88, M_w 130.000) (Fluka, Buchs, Suisse).

Dans un premier temps, 200 mg de PLGA et 100 mg de Pluronic® F68 ont été dissous séparément dans 500 μ l d'acétate d'éthyle (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) et mélangés après dissolution. Ensuite, un volume de 400 μ l de principe actif hydrophile a été ajouté (insuline ou héparine). Pour l'insuline, plusieurs types ont été utilisés : l'insuline rapide Umuline® (100 UI/mL) pour la synthèse des nanoparticules et la validation *in vitro* (Eli Lilly, Indianapolis, Etats-Unis), l'insuline cristalline (3,5 μ g / mL) pour la quantification par HPLC ou l'insuline FITC (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) pour la cytométrie en flux. Pour la validation *in vivo*, l'Insuman® (400 UI/mL, généreusement fournie par Sanofi-Aventis (Paris, France) a été utilisée afin de travailler avec des concentrations plus élevées en insuline.

Pour les héparines, trois types ont été utilisés l'énoxaparine (Lovenox®), le fondaparinux (Arixtra®) et l'héparine non fractionnée (Choay®) (Sanofi Adventis, Paris, France). L'héparine-FITC (3,5 mg / ml) (Creative PEGWorks, Etats-Unis) a été utilisée pour la cytométrie en flux. Ces 400 µL de principe actif ont été ajoutés à la phase organique, puis émulsifiés à l'aide d'une sonication (ultrasons) de 66 watts pendant 15 secondes dans un bain de glace formant ainsi la dispersion D1. Ensuite, un volume de 2 ml de phase aqueuse contenant le tensioactif c'est-à-dire soit du polyvinyle alcool (PVA) à 2,5 % m/v, soit du SDS surfactant anionique à 0,01 % m/v (Mw 288.000) (Euromedex, Souffleweyersheim, France) ou de l'eau milliQ ont été ajoutés à l'émulsion eau-dans-huile (e/h) résultante afin d'optimiser la charge des nanoparticules. Le mélange a ensuite été traité aux ultrasons pendant 10 secondes formant la dispersion D2. Puis, la double émulsion (e/h/e) a été transférée dans 10 ml de solution aqueuse de PVA (0,15 % m/v) ou d'eau milliQ afin de procéder à l'évaporation du solvant (acétate d'éthyle) soit par une agitation douce sur la nuit ou bien sous hotte aspirante pendant 2 heures. La résultante est la formation de la dispersion D3 (Figure 46).

Pour les NPs recouvertes, du chitosan CL113 (Chitosan chloride M_w 70,000 à 150,000; DD 75 à 90%) (Nova Matrix, Sandvika, Norvège) a été utilisé et le recouvrement a été effectué par interactions électrostatiques directement après la formulation des NPs par un simple transfert dans 10 mL d'un mélange eau/chitosan à 7 mg/ml (m/v) sous agitation douce. Afin de limiter la perte de NPs, aucune étape de lavage n'a été réalisée hormis pour les nanoparticules FITC. Les NPs ont été lyophilisées pour une conservation à long terme ou conservées à 4 °C.

4.1.1.2 Recouvrement acide hyaluronique/Polyéthylène glycol 200

Les nanoparticules sont recouvertes d'acide hyaluronique à une concentration de 0,1 % (m/v) (CTTM, Le Mans) ou bien recouvertes de Polyéthylène glycol 200 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) à une concentration de 30 % (v/v) préparé dans l'eau. Cet étape de recouvrement intervient durant la D3 c'est à dire l'étape d'évaporation, tout comme le recouvrement au chitosan.

4.1.1.3 Lyophilisation des NPs

Les nanoparticules ont été congelées au préalable dans un bain contenant un mélange de carboglace et d'isopropanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) à -76°C. Elles sont ensuite

lyophilisées à une température de -120°C et une pression de 150 mbar pendant minimum six heures à l'aide d'un lyophilisateur de paillasse Freezone 4.5L (Labconco, USA).

Les nanoparticules lyophilisées sont ensuite récupérées et conservées à température ambiante.

4.1.1.4 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

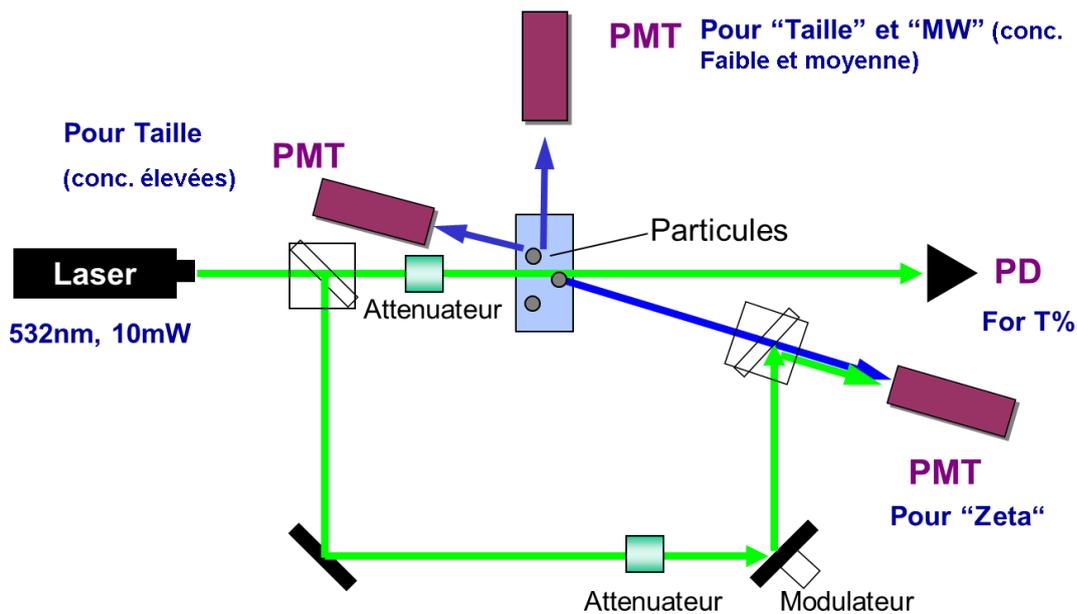


Figure 48 : Principe de la granulométrie laser

D'après Horiba

La caractérisation des NPs a été effectuée à l'aide d'un granulomètre laser Horiba NanoZS (Horiba, Japon) à 25°C selon le principe présenté figure 47.

Elle inclue la mesure de trois paramètres: la taille moyenne, la charge de surface (potentiel Zéta) et la détermination de l'indice de polydispersité (Pdl) c'est à dire la distribution en taille. La mesure de la taille des NPs se fait par mesure du coefficient de diffusion des NPs obtenu par la mesure de la vitesse de déplacement des particules. Cette mesure nous permet d'obtenir un profil bien précis donnant toutes les informations sur la taille et son homogénéité dans l'échantillon (figure 48). La dilution des échantillons est réalisée au 2000^{e} dans de l'eau milliQ®.

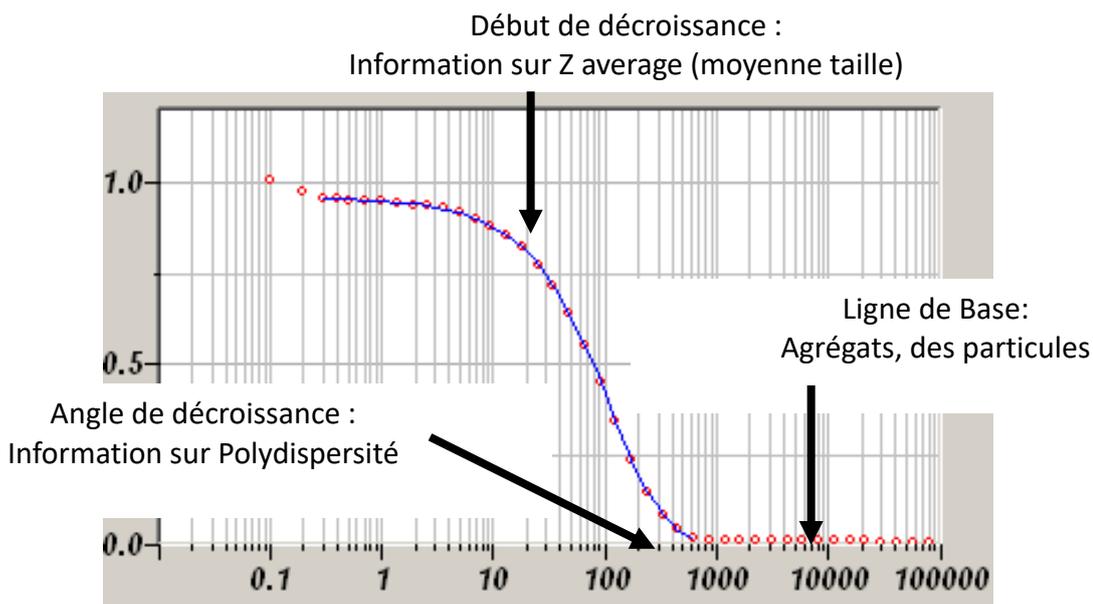


Figure 49 : Profil de la mesure de taille par granulométrie laser

D'après Horiba

Cette homogénéité en termes de taille est déterminée par la mesure de l'indice de polydispersité (Pdl). Plus sa valeur est grande et plus l'échantillon est dit « polydisperse », c'est-à-dire non homogène en taille. Horiba fixe les limites suivantes :

- Si le Pdl est $< 0,1$, l'échantillon est dit monodisperse.
- Pour un Pdl entre $0,1$ et $0,5$, l'échantillon est standard
- Si le Pdl est $> 0,7$, l'échantillon est extrêmement polydisperse et donc la mesure est peu fiable.

Pour la mesure de la charge de surface (potentiel zêta), un champ électrique E est appliqué entre deux électrodes ce qui induit un déplacement des nanoparticules. Un laser est ensuite dirigé créant des interactions avec les particules qui génèrent un signal diffusé.

Ainsi le potentiel zêta est déduit de la mobilité des particules induite qui modifie la fréquence du signal diffusé (Figure 49). La dilution des échantillons est réalisée au 10^e dans du chlorure de sodium à 5 % (m/v).

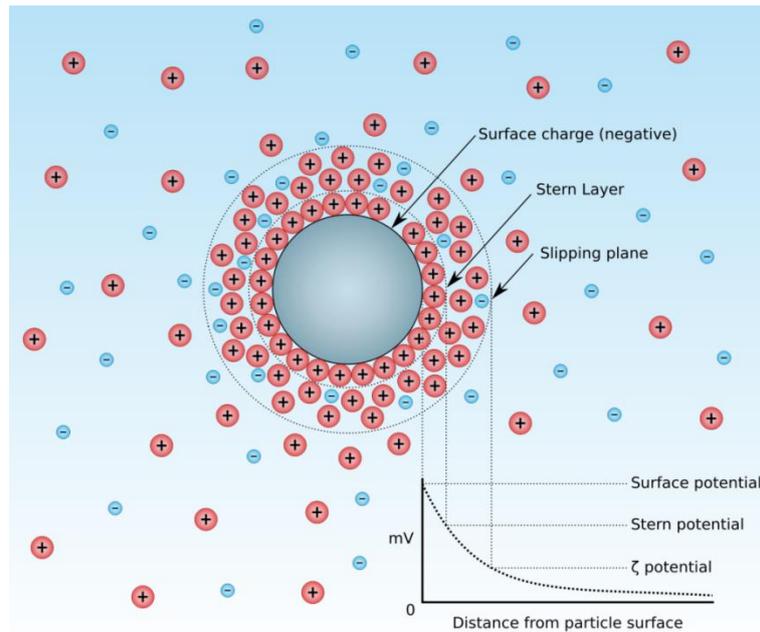


Figure 50 : Principe de la mesure de la charge de surface par granulométrie laser

4.1.1.5 Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation a été déterminée après centrifugation des NPs (20 000 × g, 4°C pendant 1 heure) de façon indirecte pour les deux principes actifs étudiés (Figure 50). Pour la quantification de l'insuline non encapsulée, la méthode HPLC basée sur la monographie de la pharmacopée européenne a été utilisée (voir paragraphe 4.1.1.5.1). Pour la quantification de l'héparine non encapsulée, une méthode UV-Visible avec du bleu de méthylène a été utilisée (voir paragraphe 4.1.1.5.2). L'équation suivante a ensuite été utilisée pour déterminer cette efficacité d'encapsulation :

$$EE (\%) = ((\text{quantité de principe actif théorique} - \text{quantité mesurée}) / \text{quantité théorique de principe actif}) \times 100.$$

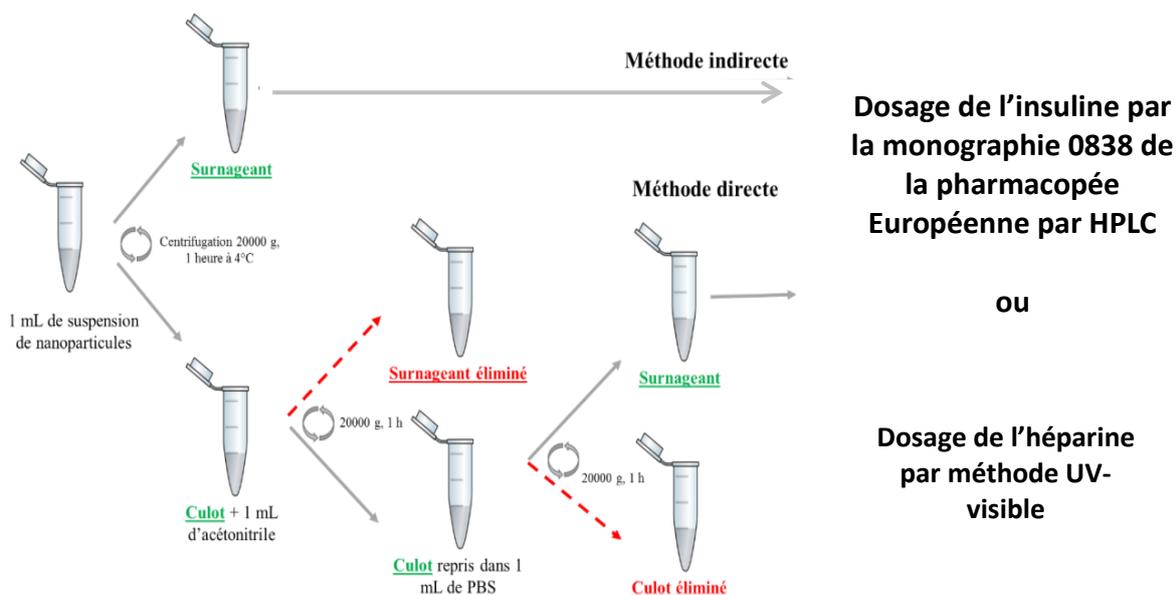


Figure 51 : Protocole de détermination de l'efficacité d'encapsulation de l'insuline ou de l'héparine

4.1.1.5.1 Quantification de l'insuline par méthode HPLC

La quantification de l'insuline s'est faite par méthode HPLC comme décrite dans le matériel et méthode de la validation après modification de la méthode Pharmacopée Européenne (4.2).

4.1.1.5.2 Quantification de l'héparine par méthode UV-visible

La méthode de quantification de l'héparine par dosage UV-visible utilisée est basée sur la méthode colorimétrique Azure II (Pazzini *et al.*, 2015). Son principe est basé sur la réaction entre l'Azure II qui est un composé de bleu de méthylène et l'héparine. La réaction serait basée sur l'interaction des groupes anioniques de l'héparine (les sulfates) avec les groupes cationiques du bleu de méthylène par des forces électrostatiques non spécifiques (Jiao *et al.*, 1999; Liu, 1998). Pour cela, 500 µL de surnageant était mélangé avec 4,5 mL de solution azure II (Sigma Aldrich (Saint Louis, USA), solution à base de bleu de méthylène, préparée à 0,05 µg/mL. Ensuite, l'absorbance a été mesurée à 500 nm à l'aide d'un biospectromètre kinetic UV-visible (Eppendorf, Allemagne).

4.1.1.6 **Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les échantillons de NPs étaient examinés par MEB en termes de morphologie. Pour cela, 1 mL de NPs ont été redispersées dans 100 mL d'eau distillée puis 1 mL de la suspension a été prélevé et séché à l'air puis revêtu de carbone avant l'examen par MEB à 5 kV (Hitachi S800, Tokyo, Japon).

4.1.1.7 Tests de stabilité des nanoparticules dans le temps

La taille, le Pdl et le potentiel zêta des NPs ont été mesurés comme décrit ci-dessus une fois par semaine pendant trois semaines afin de tester la stabilité de ces paramètres physico-chimiques dans le temps.

4.1.1.8 Test de stabilité des NPs en milieux simulés

Selon la pharmacopée européenne, le milieu gastrique contenait du NaCl 35 mM et du HCl 80 mM à pH 1,2 et le milieu intestinal a été préparé avec du KH₂PO₄ 50 mM et du NaOH 15 mM ajusté à pH 6,8. Les milieux simulés ont été préparés sans enzyme pour permettre la quantification des principes actifs et la stabilité a été testée uniquement en fonction du pH des milieux. Ensuite, les NPs ont été incubées avec du milieu (v/v) à 37 °C et à des temps de 30 minutes et 4 heures, des échantillons ont été centrifugés et la quantité de principe actif libre a été mesurée par HPLC (voir paragraphe 4.2.2) ou UV-visible comme décrit précédemment. Les résultats sont exprimés en pourcentage de libération de principe actif.

4.1.2 Validation *in vitro*

4.1.2.1 Modèles *in vitro* et culture cellulaire

Deux modèles de culture cellulaire ont été utilisés: Caco-2 et co-culture (75% Caco-2 + 25% RevHT29MTX) comme décrit par Nollevaux *et al.*, 2006 avec de légères modifications (Diop *et al.*, 2015) (Figure 51). La lignée Caco-2 a été obtenue de the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, Etats-Unis) et la lignée RevHT29MTX a été fournie par le Dr. Thécla Lesuffleur (INSERM U505, Villejuif, France). La culture cellulaire a été réalisée comme décrit par Reix *et al.*, 2012. Brièvement, les cellules ont étéensemencées à une densité de 73 000 cellules/cm² dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) contenant 4,5 g/L de glucose et de L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le milieu a été complété avec 20 % de sérum de veau fœtale (SVF) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis), concentration recommandée par le fournisseur ATCC et Yee (1997). Une solution antibiotique-antimitotique à 1 % ainsi que 1 % de solution d'acides aminés à 10 mM ont également été ajoutés (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cellules ont été cultivées pendant 21 jours (pour acquérir le phénotype des entérocytes) à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et ont été utilisées à partir du passage 25 jusqu'au passage 60.



Figure 52 : Modèles *in vitro* utilisés

4.1.2.2 Toxicité des nanoparticules

La toxicité a été déterminée en mesurant l'activité mitochondriale des cellules grâce au test CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay de chez Promega Corporation (Madison, WI, USA). Pour cela, les cellules (19 200 cellules/puits) ont étéensemencées sur des plaques 96 puits (CELLSTAR[®], ThermoFisher, USA) et cultivées pendant 21 jours pour les différencier. Ensuite, après un screening de différentes concentrations, une concentration en NPs de 5 mg de PLGA/puit a été sélectionnée pour les tests *in vitro*. En effet, cette concentration d'insuline contenue dans 5 mg de PLGA/puits correspond à 0.5-1 UI par puit ce qui est proche de la concentration *in vivo*. Puis, les NPs ont été incubées sur les cellules pendant 4 heures et ont été lavées trois fois (10 minutes) avec une solution de HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sans calcium et sans magnésium. Après traitement, 100 μ L de milieu de culture avec 20 μ L de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium (MTS) ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 37 °C et l'absorbance a été mesurée à 490 nm dans un lecteur de microplaques Metertech 960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwan). La quantité de produit formé, le formazan est directement proportionnelle à l'activité mitochondriale, qui est liée au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par rapport au témoin négatif (cellules non traitées).

4.1.2.3 Mesures de la résistance électrique trans-épithéliales

Les cellules (200 000) ont étéensemencées sur un insert de 0,336 cm² et cultivées pendant 21 jours afin de reproduire *in vitro* un épithélium intestinal. Les cellules ont ensuite été incubées avec des NPs et la TEER a été mesurée toutes les heures pendant 4 heures. L'EGTA a été utilisé comme contrôle positif de l'ouverture des jonctions serrées. Le contrôle négatif a consisté en

des cellules sans traitement (Figure 52). Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de la TEER.

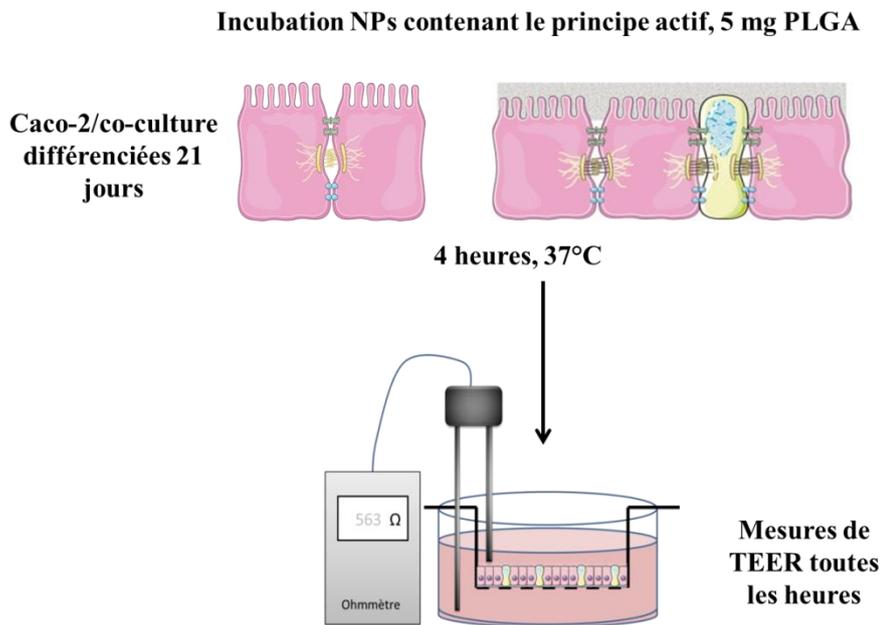


Figure 53 : Protocole de mesure de la TEER

4.1.2.4 Etude du passage intestinal des nanoparticules par cytométrie en flux

4.1.2.4.1 Filtration des NPs contenant un principe actif couplé FITC

Les nanoparticules formulées avec un principe actif couplé à du FITC ont d'abord été filtrées sur colonne Sephadex® G25 (ThermoFisher, Etats-Unis).

Pour cela, les colonnes ont été d'abord conditionnées avec cinq rinçages à l'aide de 2 mL d'eau milliQ pour un volume total de rinçage de 25 mL. Ensuite 2 mL de nanoparticules ont été filtrées et éluées avec 5 mL d'eau milliQ. Cinq rinçages ont à nouveau été effectués entre deux filtrations de nanoparticules. Une colonne était utilisée pour une formulation de nanoparticules.

4.1.2.4.2 Quantification du passage intestinal

Pour quantifier l'internalisation des nanoparticules par cytométrie en flux, la molécule fluorescéine (FITC) a été couplée à nos deux principes actifs (insuline et héparine) (Figure 53) commercialisées prêtes à l'emploi. La fluorescéine est une substance dérivée du xanthène qui émet une lumière réfléchie de fluorescence lorsqu'elle est excitée sous les ultraviolets et absorbe à 494 nm. On obtient ainsi de l'insuline-FITC et l'héparine-FITC (non fractionnée).

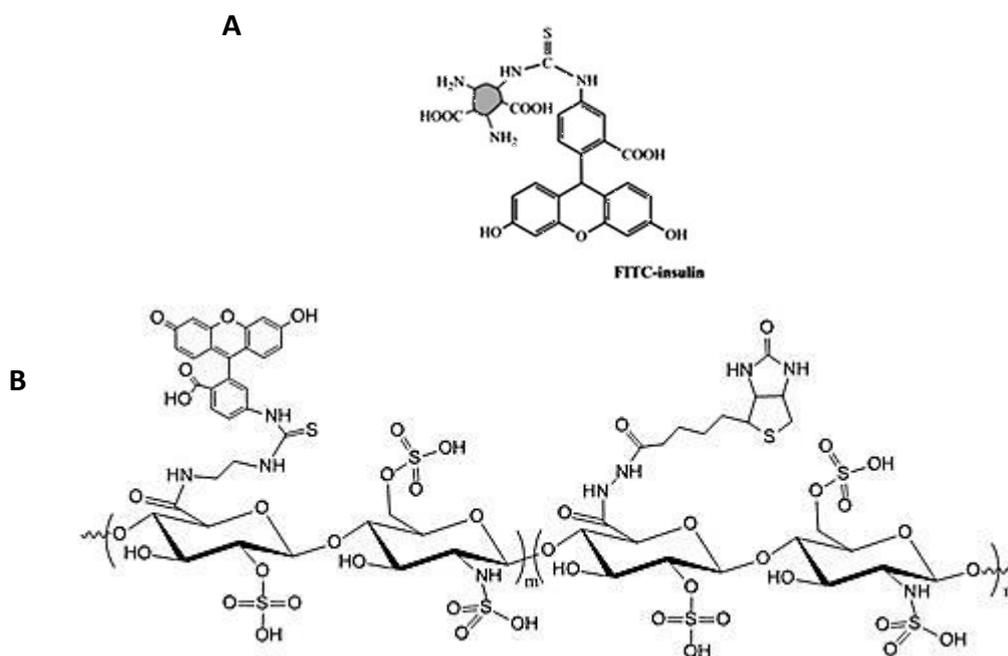


Figure 54 : Structure de l'insuline-FITC (A) et de l'héparine-FITC (B)

Pour étudier l'absorption intestinale des NPs dans nos deux modèles de culture cellulaire, la technique de cytométrie en flux a été utilisée comme décrit par Reix *et al.*, 2012 (Reix *et al.*, 2012b) (Figure 54). Brièvement, les cellules ont été cultivées dans des plaques 24 puits pendant 21 jours pour permettre leur différenciation. Les cellules ont ensuite été incubées avec des NPs chargées d'insuline FITC (5 mg de PLGA/puit) ou d'héparine FITC (5 mg PLGA/puit) selon l'étude, dispersées dans du DMEM sans SVF pendant 4 heures. Les cellules ont été lavées trois fois (10 minutes) avec une solution d'HBSS dépourvue de calcium et de magnésium puis séparées par l'action de la trypsine (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), centrifugées et remises en suspension dans du HBSS. Les échantillons ont été analysés par un cytomètre en flux BD LSR II (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, États-Unis) en triple exemplaires et 10 000 événements ont été enregistrés par puits. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel FlowJo (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, États-Unis) et sont exprimés en quantité de fluorescence intracellulaire.

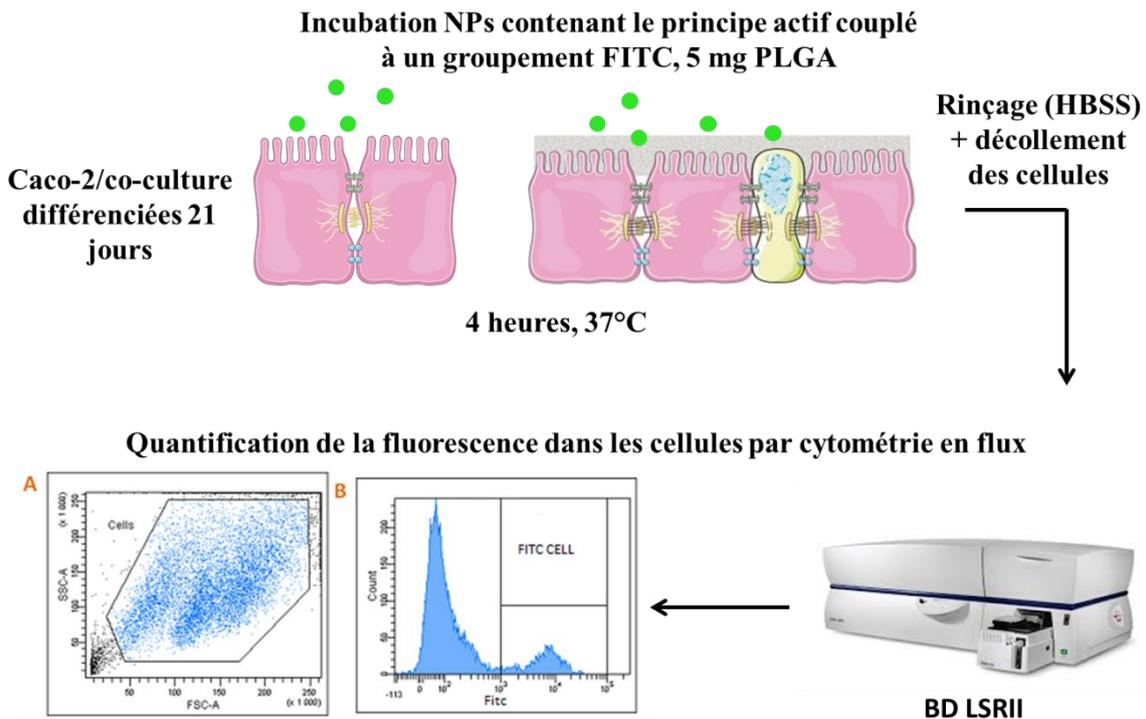


Figure 55 : Protocole de quantification de l'internalisation des NPs par cytométrie en flux

4.1.3 Le vecteur gastro-résistant

4.1.3.1 Formulation du vecteur gastro-résistant d'alginate

Le vecteur pharmaceutique complexe a été formulé par gélification ionotropique de l'alginate avec des ions calcium (Figure 55).

Tout d'abord, un volume de 10 mL de suspension de nanoparticules a été mélangé à 30 mL de d'une solution d'alginate de sodium (Alfa Aesar, Thermofisher, Etats-Unis). Ensuite grâce à un pousse seringue, le mélange a été introduit au goutte à goutte dans un volume de 100 mL d'huile pharmaceutique (Mygliol® 812, Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) sous agitation à 1200 tr/min à un débit de 2 mL par minute.

L'agitation a été ensuite maintenue à la même vitesse pendant une heure à température ambiante. Puis un mélange d'huile pharmaceutique (Mygliol® 812) et d'acide acétique (20/2 ; v/v) est introduit au même débit et sous la même intensité d'agitation. Puis 160 mL d'une solution aqueuse de chlorure de calcium à 5 % (m/v) au même débit a été introduit et laissé sous agitation une heure température ambiante. La vitesse a ensuite été réduite à 300 tr/min et maintenue pendant 12 heures.

Les phases huile/eau ont ensuite été séparées afin de récupérer les billes encapsulant les nanoparticules à l'aide de l'ampoule à décanter. Les véhicules sont récupérés au fur et à

mesure. Un lavage des billes d'alginate a été réalisé sur un tamis d'une porosité de $0,2\ \mu\text{m}$ à l'aide d'un détergeant, du tween® 80 à 2 % (m/v) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis). Puis les véhicules ont été mélangés à l'aide d'un agitateur 3D pendant deux heures à 200 mL de tween® 80. Enfin, ils ont été lavés sur un tamis de $0,2\ \mu\text{m}$ au tween® 80 puis à l'eau et on été récupérés pour être stockés à 4°C .

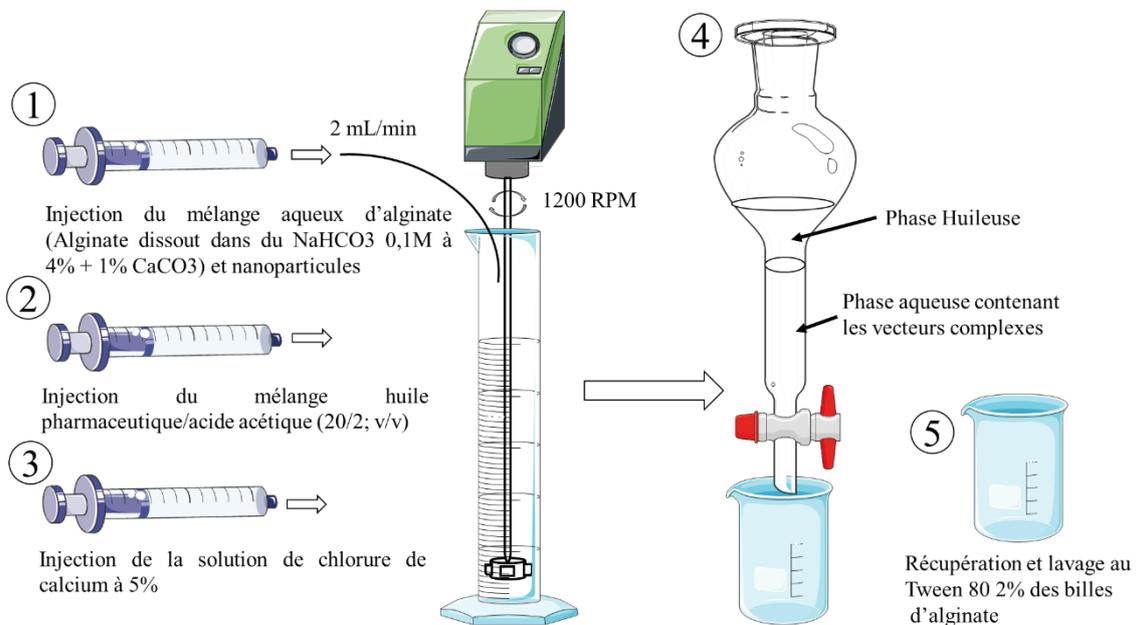


Figure 56 : Protocole de formulation des véhicules gastro-résistants à base d'alginate par gélation ionotropique

4.1.3.2 Validation du vecteur gastro-résistant

Une fois formulés, les véhicules gastro-résistants d'alginate ont été observés au microscope afin de vérifier la forme des « billes » et la présence de nanoparticules à l'intérieur. Leur stabilité en milieux simulés a ensuite été testée. Pour cela, selon la pharmacopée européenne, le milieu gastrique contenait du NaCl à 35 mM et du HCl à 80 mM, pH 1,2 et le milieu intestinal a été préparé avec du KH_2PO_4 à 50 mM et du NaOH à 15 mM ajusté à pH 6,8 comme pour la stabilité des nanoparticules. La stabilité a ensuite été testée uniquement en fonction du pH des milieux. Pour cela, 100 μL de véhicules ont été incubées avec 10 mL de milieu simulés à 37°C . A t_0 , $t_{30\text{minutes}}$, $t_{1\text{h}}$ et $t_{2\text{h}}$, des échantillons ont été prélevés et observés au microscope afin de voir si les véhicules restent intègres.

4.1.4 Validation ex-vivo des NPs d'héparine

Dans un premier temps, des prélèvements sanguins ont été effectués sur des rats mâles Wistar par la queue. Pour le test de dissolution, des nanoparticules formulées avec trois types

d'héparine, l'énoxaparine, le fondaparinux et l'héparine non fractionnée, ont été incubées pendant deux heures dans les échantillons de sang. Pendant ces deux heures des prélèvements ont été effectués à $t_{15}, t_{30}, t_{45}, t_{60}$ et t_{120} minutes puis centrifugés à 10000 g pendant deux minutes avec décantation intermédiaire et aliquotés avec une conservation à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'aux tests.

Afin de quantifier l'héparine libérée des nanoparticules dans le sang, un test basé sur une méthode chromogénique anti facteur de coagulation, le facteur Xa à l'aide d'un kit de dosage (biophen, aniara, USA) a été utilisé.

4.1.5 Validation *in vivo* des NPs d'insuline

4.1.5.1 Modèle animal

Toutes les expériences sur les animaux ont été effectuées en conformité avec les directives des institutions européennes concernant les soins et l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales (numéro d'agrément de l'animalerie du laboratoire: C67-482-28, numéro de saisine AL/60/67/02/13). Des rats mâles Wistar (Charles River, Wilmington, USA) de poids compris entre 120 et 140 g sont placés dans des cages collectives standards, au sein d'une salle à température ambiante régulée ($23\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Les rats sont maintenus dans un cycle circadien de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière, et sont nourris avec un régime standard pour animaux de laboratoire sous forme de granulés (SAFE A04, Villemoisson-sur-Orge, France). Les animaux ont accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*. Le diabète est induit par une dose unique de streptozotocine (Sigma Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) par voie intrapéritonéale à la dose de 100 mg/kg. Le diabète (statut insulino-pénique des animaux) est établi après trois jours (glycémie $> 6\text{ g/L}$ et C-peptide $< 100\text{ pmol/L}$). Des réinjections de STZ peuvent avoir lieu pour les rats non diabétiques. Après 5 jours, un suivi à jeun est réalisé afin de sélectionner les rats les moins sensibles au jeûne.

4.1.5.2 Validation des NPs par injections SC/IP

Des injections par voie sous-cutanée et intrapéritonéale ont été réalisées sur deux jours sur deux groupes de rat ($n=3$), où trois rats ont reçu de l'insuline libre à 5 UI/rat et trois rats ont reçu des nanoparticules formulées avec du SDS avec ou sans recouvrement à l'acide hyaluronique à 5 UI/rat.

L'insuline humaine est ensuite dosée dans les échantillons sanguins prélevés par kit ELISA (Merckodia, Suède).

4.1.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism 7 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis). Les données *in vitro* ont été analysées par ANOVA à un facteur avec le test post-hoc de LSD Fisher pour les données paramétriques ou Kruskal-Wallis pour l'analyse non-paramétrique. Les données *in vivo* ont été analysées par ANOVA à mesures répétées ou ANOVA à un facteur avec un test post-hoc de LSD Fischer. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM ou \pm ET. Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.

4.2 Validation de la méthode de quantification de l'insuline par HPLC

4.2.1 Préparation des solutions

L'insuline humaine a été préparée à 3,5 mg/ml et l'insuline porcine à 4,0 mg/ml à pH = 7,2 et stockée à -20 °C jusqu'à utilisation. A partir de cette solution, différentes concentrations d'insuline cristalline ont été préparées dans l'HCl 0,01 M à 16, 50, 100, 300 et 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les courbes d'étalonnage et à 30, 80 et 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour la détermination de la justesse et de la fidélité. Les insulines humaines commerciales utilisées, Umuline® et Insuman®, ont été préparées respectivement à 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans l'HCl 0,01 M et ont été analysées sans aucune préparation spéciale.

4.2.2 Quantification de l'insuline par HPLC-DAD

Pour quantifier l'insuline, des analyses ont été effectuées basée sur la monographie sur l'insuline de la Pharmacopée Européenne (pharmacopeia-8.0, 2008). Elle décrit une technique HPLC-DAD avec un système HPLC Varian (pompe Prostar) couplé à un détecteur Varian Prostar 330 Photodiode Array (Varian, USA) et un injecteur ProStar 410 avec un volume d'injection de 20 μL (Varian, USA) (Figure 57). La séparation chromatographique a été réalisée à 40 °C (référence) avec une colonne Waters C18 Symmetry® (5 μm , 250 x 4,6 mm, 300 Å) (Waters, Milford, Etats-Unis). Selon la Pharmacopée Européenne, la phase mobile de référence consistait en un mélange à 42:58 (A:B) d'une phase A (solution aqueuse de sulfate de sodium

200 mM ajustée à pH = 2,3 avec de l'acide phosphorique) et d'une phase B (mélange 55:45 de phase A: acétonitrile) (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). La concentration finale de sulfate de sodium en phase mobile était dans ces conditions de 148 mM. Diverses concentrations en sulfate de sodium (SDS, Peypin, France) ont été testées pour la phase A (30, 50 ou 100 mM), ce qui a conduit à des concentrations finales de sulfate de sodium de respectivement 22, 37 ou 74 mM. L'éluion a été réalisée de manière isocratique à un débit de 1,0 ml/min. La longueur d'onde de quantification choisie était de 214 nm. L'acquisition et l'intégration des données ont été réalisées avec le logiciel StarChromatography Workstation Ver6.41 (Varian, Etats-Unis). Le contenu inconnu des échantillons d'insuline a été calculé par rapport à la surface du pic chromatographique en utilisant la méthode de l'étalonnage externe.

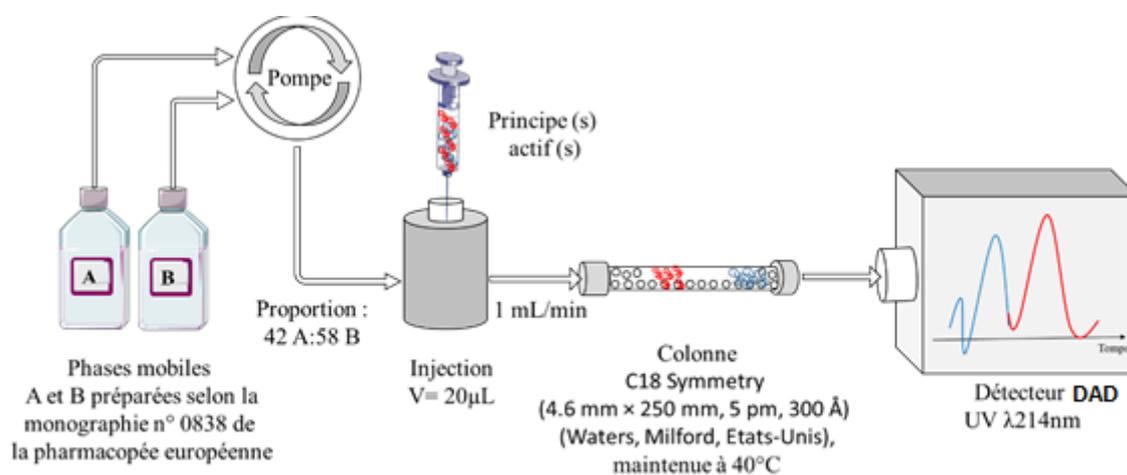


Figure 58 : HPLC-DAD pour la quantification d'insuline

4.2.3 Validation de méthode

La méthode a été validée en termes de sélectivité, sensibilité, linéarité, fidélité et justesse selon les directives ICH (ICHQ2(R1), 2005). Les conditions chromatographiques de référence et optimisées (concentrations de sulfate de sodium 148 mM et 37 mM) ont été comparées au cours du processus de validation complet. Tous les échantillons ont été analysés chaque jour en trois exemplaires et sur trois jours différents.

4.2.3.1 Sélectivité

La sélectivité de la méthode a été évaluée selon la Pharmacopée Européenne (Pharmacopoeia-8.0, 2014), avec une injection de 20 µL d'un mélange d'insuline porcine et humaine à une concentration de 2 mg.ml⁻¹ et la résolution (R_s) obtenue entre les pics a été

calculée avec une résolution minimale fixée à 1,2. De plus, le facteur d'asymétrie (A_s) du pic de l'insuline humaine a été déterminé selon l'équation suivante : $A_s = W_{0,05} / 2d$

où $W_{0,05}$ est la largeur du pic à un vingtième de sa hauteur et d est la distance entre les perpendiculaires à la ligne de base tracées au maximum du pic et au bord avant du pic à un vingtième de la hauteur du pic. Une valeur A_s de 1,0 signifie une symétrie du pic. Lorsque $A_s > 1,0$, le pic présente une traînée. Lorsque $A_s < 1,0$, le pic présente un élargissement en fin de pic (pharmacopeia-8.0, 2008). De plus, la sélectivité a été évaluée en termes de pureté du pic au moyen d'une comparaison des spectres UV obtenus avec le détecteur à barrettes de diode au niveau des pentes ascendante et descendante ainsi qu'au niveau de l'apex du pic. Enfin, le facteur d'asymétrie a également été déterminé pour toutes les concentrations en sulfate de sodium.

4.2.3.2 Sensibilité et linéarité

La limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été obtenues en injectant successivement des solutions étalons diluées dans du HCl 0,01 M. La détermination de la LOD et de la LOQ était basée sur le calcul du rapport signal/bruit de 3 pour la LOD et de 10 pour la LOQ. La justesse et la fidélité à la LOQ ont été vérifiées par l'analyse de dix échantillons préparés à proximité de la limite de quantification. Cinq solutions standards contenant de l'insuline humaine (16, 50, 100, 300 et 600 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) ont été utilisées pour les courbes d'étalonnage. Ces courbes ont été évaluées sur la base de la concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) par rapport à la surface du pic (nA.s). Trois équations linéaires différentes ont été testées quotidiennement: " $ax + b$ " (ajustement linéaire des moindres carrés calculé avec cinq solutions injectées en triple), " $ax + 0$ " (ajustement linéaire des moindres carrés forcé à l'origine calculé avec cinq solutions injectées en triple) et " ax " (proportionnalité simple en utilisant la solution à 600 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ et en utilisant l'aire moyen du pic de cette solution injectée en triple). Pour confirmer la linéarité de la fonction d'étalonnage, le test de «lack of fit» suggéré par Araujo *et al.* (Araujo *et al.*, 2012) a été utilisé. Ce test compare, au moyen d'un test de Fisher, la variance due au «lack of fit» à la variance due à l'erreur expérimentale pure. Si la valeur p calculée est inférieure à 0,05, la méthode n'est pas linéaire.

4.2.3.3 Fidélité

La fidélité de la méthode a été évaluée en quantifiant l'insuline humaine dans trois solutions préparées à 30, 80 et 400 µg.ml⁻¹ et dans deux insulines commerciales sur trois jours différents afin d'accéder à la répétabilité (fidélité entre les jours (intra)) et à la fidélité intermédiaire (d'un jour à l'autre (inter)). Chaque jour, la quantification a été réalisée à l'aide des trois courbes d'étalonnage quotidiennes, ax+b, ax+0 et ax. Les données statistiques, telles que la concentration moyenne globale sur trois jours, la répétabilité (intra) et la fidélité (inter) quotidienne pour chaque étalonnage ont été calculées en utilisant une analyse de variance à un facteur (jour de quantification).

4.2.3.4 Justesse

La justesse de la méthode a été évaluée sur les mêmes échantillons et dans les mêmes conditions que la fidélité. Les concentrations moyennes globales des trois jours ont été calculées en mg.ml⁻¹ et le biais a été déterminé en pourcentage selon la formule:

$$\text{Biais (\%)} = \frac{\text{concentration moyenne calculée} - \text{concentration de référence}}{\text{concentration de référence}}$$

où la concentration moyenne calculée correspond à la concentration moyenne globale des trois jours pour un échantillon donné et une courbe d'étalonnage donnée.

La concentration de référence, elle, correspond à la concentration attendue (solutions préparées ou étiquetage de l'échantillon commercial) ou bien à la concentration moyenne obtenue sur les trois jours avec la méthode de référence de la Pharmacopée Européenne (148 mM) pour la même courbe d'étalonnage permettant ainsi la comparaison des deux méthodes.

Les résultats de la thèse

5 Résultats

5.1 Validation de la méthode de quantification de l'insuline par HPLC

5.1.1 Contexte de l'étude

Afin de tester l'efficacité biologique d'un système d'encapsulation tel que les nanoparticules de PLGA, leur caractérisation physico-chimique ainsi que la détermination de la quantité de principe actif encapsulée reste indispensable au préalable. C'est donc dans ce contexte que la détermination de la teneur en insuline est essentielle (Reix *et al.*, 2012b). Pour cela, diverses méthodes existent comme le dosage immuno-enzymatique (ELISA) (Hoier *et al.*, 1993),(Lasalle, 2011) la méthode par spectrométrie d'absorption dans l'UV ou encore la chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie d'absorption dans l'UV décrite dans la monographie de la Pharmacopée Européenne ou par spectrométrie de masse (Chen *et al.*, 2013). Plus en détails, la monographie décrit une méthode de chromatographie liquide isocratique sur colonne C18 avec détection par spectrométrie d'absorption dans l'UV (Pharmacopoeia-8.0, 2014). Afin d'exposer les parties hydrophobes de l'insuline et permettre ainsi une meilleure rétention sur colonne C18, une forte concentration en sulfate de sodium est utilisée dans la phase mobile de 148 mM. Cependant, cette concentration élevée en sels entraîne l'accumulation de cristaux de sel dans la tubulure et la pompe. Pour résoudre ce problème, il a été proposé de réduire la concentration en tampon salin de la phase mobile tout en maintenant les performances chromatographiques afin d'effectuer une quantification précise de l'insuline. Selon la pharmacopée Européenne (pharmacopeia-8.0, 2008), une variation de plus de 10 % de la composition en sel tampon nécessite une validation supplémentaire de la méthode. Cette validation de méthode doit être réalisée selon la validation des procédures analytiques de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation ICHQ2R (ICHQ2(R1), 2005), c'est-à-dire la sélectivité, la linéarité, la justesse et la fidélité. La sélectivité et la sensibilité de la méthode validée ont été vérifiées dans le contexte de la quantification de l'insuline dans nos systèmes de nanoparticules formulés avec des insulines commerciales (umuline® et Insuman®).

5.1.2 Modification de la concentration en sulfate de sodium de la phase mobile

Afin de réduire la quantité de sel, différentes concentrations en Na_2SO_4 ont été testées et l'impact sur la résolution entre l'insuline humaine et porcine ainsi que la symétrie du pic de l'insuline humaine (Tableau 3) ont été évalués. D'après la monographie sur l'insuline humaine de la Pharmacopée Européenne, la résolution entre les deux pics devrait être au moins de 1,2 (Pharmacopoeia-8.0, 2014). Pour le facteur d'asymétrie du pic, celui-ci doit être égale à 1 pour une parfaite symétrie.

Les résultats montrent que jusqu'à une concentration de 37 mM, la résolution entre les deux pics d'insuline porcine et d'insuline humaine était largement supérieure à 1,2 puis diminuait rapidement pour une concentration de 23 mM. Pour le facteur d'asymétrie, les valeurs étaient toutes proches de 1 exceptée pour une concentration en sels de 23 mM avec une valeur de 1,750 ce qui signifie que le pic présente une trainée ($A_s > 1$) confirmé par l'aspect du pic (Figure 58) (pharmacopoeia-8.0, 2008).

Afin de fournir une bonne robustesse à la méthode, la concentration de 37 mM autorisant des résolutions et des facteurs d'asymétrie acceptables a été choisie.

Concentration en Na_2SO_4 (mM)	Résolution (R_s)	Facteur d'asymétrie (A_s)
148	1,51	1,075
74	1,53	1,105
37	1,43	1,075
23	1,22	1,750

Tableau 3 : Résolution et facteur d'asymétrie

La résolution entre le pic de l'insuline porcine et le pic de l'insuline humaine à 2mg/mL ainsi que le facteur d'asymétrie du pic de l'insuline humaine ont été déterminés pour différentes concentrations de sulfate de sodium dans la phase mobile.

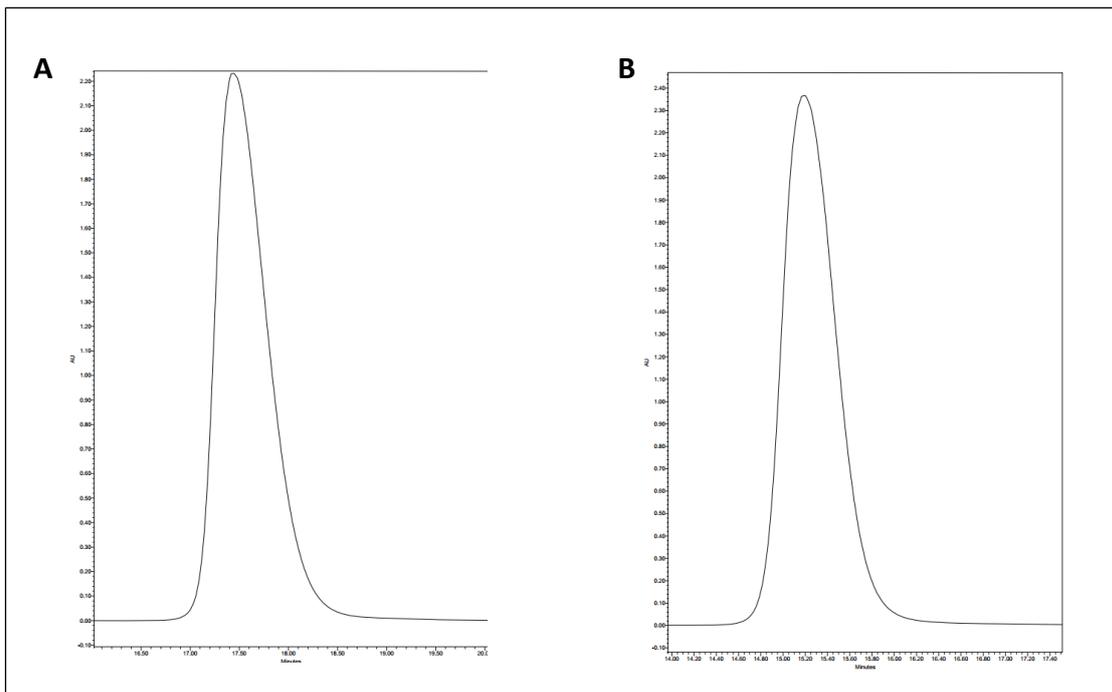


Figure 59 : Aspect du pic de l'insuline humaine

L'aspect des pics de chaque chromatogramme a été exposé pour une concentration en sel de 23 mM (A) ou de 37 mM (B).

5.1.3 Validation de méthode

La validation de méthode a été réalisée en parallèle pour les deux phases mobiles, celle de la Pharmacopée Européenne à 148 mM de sulfate de sodium et la nouvelle concentration à 37mM de sulfate de sodium.

5.1.3.1 Linéarité et sensibilité

Les valeurs LOD et LOQ basées sur la détermination du rapport signal sur bruit (S/N) étaient respectivement de 1,6 et 4,5 µg/mL pour les deux compositions en phase mobile. Basée sur la loi de Beer-Lambert, conforme au détecteur UV, trois droites de régression linéaires différentes ont été évaluées sur trois jours différents et pour les deux compositions en phase mobile. Comme le montre le tableau 4, une bonne linéarité a été obtenue pour chaque droite de régression avec des coefficients de corrélation $R^2 \geq 0,997$ dans l'intervalle de concentration étudié. De plus, la linéarité des données a été confirmée par le test du lack of fit pour lequel les valeurs de p correspondent au rapport de variance du test de Fisher (p-value

lof). Ces valeurs étaient supérieures à 0,05 lorsqu'elles ont été déterminées (cette valeur p ne peut pas être calculée pour une droite de régression à un point, $y = ax$).

Concentration en sulfate de sodium			150 mM		37 mM				
Jour	Equation	R ²	Valeur de p b=0	Valeur de p lof	Jour	equation	R ²	Valeur de p b=0	Valeur de p lof
ax+b									
a	y=114803x+108652	0,9987	0,76	0,25	d	y=119183x-12000	0,9968	0,98	0,16
b	y=105296x-285135	0,9994	0,23	0,66	e	y=116310x-128947	0,9983	0,76	0,94
c	y=106040x+151600	0,9993	0,53	0,06	f	y=103553x+253252	0,9991	0,35	0,06
ax+0									
a	y=115053x	0,9994	-	0,36	d	y=119156x	0,9984	-	0,25
b	y=104639x	0,9996	-	0,57	e	y=116012x	0,9991	-	0,97
c	y=106390x	0,9996	-	0,09	f	y=104136x	0,9995	-	0,07
Ax									
a	y=114244x	0,9995	-	-	d	y=120353x	0,9997	-	-
b	y=105114x	0,9998	-	-	e	y=115800x	0,9990	-	-
c	y=105663x	0,9998	-	-	f	y=103257x	0,9999	-	-

Tableau 4 : Validation de la méthode en termes de linéarité

La linéarité a été déterminée sur 6 jours différents : a,b,c,d,e,f– Les p-values ont été obtenues avec un test de Student (testant la nullité de b) ou de Fischer (test du lack of fit (lof) par la droite de régression).

La droite de régression «ax+b» utilise une ordonnée à l'origine différente de 0. Pour évaluer la sélectivité de la méthode, les valeurs de b sont comparées à 0. Pour chaque jour et chaque composition de phase mobile, les valeurs de p du test de Student correspondantes (p-value pour b=0) étaient toujours beaucoup plus élevées que 0,05 indiquant une valeur de b statistiquement non différente de 0 prouvant la sélectivité de la méthode pour les échantillons standards. Ces résultats indiquent que les droites de régression proposées conviennent pour la quantification de l'insuline avec les deux phases mobiles.

5.1.3.2 Justesse et sélectivité

La justesse a été évaluée sur trois échantillons préparés et sur deux échantillons commerciaux d'insuline (Tableau 5). Pour une même composition de phase mobile et un même échantillon, les biais ne sont pas significativement différents selon la droite de régression utilisée afin de déterminer la concentration calculée. Les valeurs de biais ont été comprises entre -3% et 8% et sont donc totalement acceptables pour une concentration en sels de 37 mM. Cependant, des valeurs de biais très élevées (jusqu'à 14%) ont été obtenues pour les solutions d'Insuman® pour une phase mobile contenant 150mM de sulfate de sodium. Cet excès pourrait être

attribué à un manque de sélectivité avec cette phase mobile, mais l'analyse de la pureté du pic n'a pas pu le prouver (les pentes ascendantes et descendantes ainsi que le sommet du pic étaient identiques). Le tableau 6 met en évidence les biais observés entre les résultats obtenus avec les différentes phases mobiles en fonction du type d'échantillon.

Concentration en sulfate de sodium		150 mM				37 mM					
Echantillon n	30	80	400	120 Umuline®	480 Insuman®	Echantillon n	30	80	400	120 Umuline®	480 Insuman®
µg/mL						µg/mL					
ax+b											
Moyenne	29,3	80,8	387,2	127,0	540,1	Moyenne	29,2	80,5	400,2	119,4	511,7
biais %	-2,43	1,02	-3,19	6,74	13,46	biais %	-2,62	0,57	0,04	0,37	7,50
ax+0											
Moyenne	29,2	80,7	387,2	126,9	540,1	Moyenne	29,6	80,8	400,2	119,7	511,6
biais %	-2,77	0,90	-3,19	6,67	13,47	biais %	-1,36	0,99	0,05	0,61	7,49
Ax											
Moyenne	29,3	81,0	388,4	127,3	541,8	Moyenne	29,6	80,8	400,2	119,8	511,8
biais %	-2,47	1,23	-2,89	7,01	13,82	biais %	-1,34	1,00	0,06	0,64	7,51

Tableau 5 : Données de validation de méthode en termes de justesse

La justesse a été déterminée sur 3 jours avec 3 déterminations par jour.

Echantillon	ax+b	ax+0	ax
30	-0,20	1,45	1,16
80	-0,45	0,09	-0,23
400	3,33	3,34	3,04
Umuline®	-5,96	-5,68	-5,95
Insuman®	-5,25	-5,27	-5,54

Tableau 6 : Valeurs des Biais (%)

Ces valeurs ont été obtenues entre une concentration de 37 mM de et une concentration de 148 mM de sulfate de sodium dans la phase mobile

5.1.3.3 Fidélité

Tous les résultats concernant la fidélité sont résumés dans le tableau 7. On a trouvé que la répétabilité (CV_r) et la fidélité intermédiaire (%) (CV_{PI}) étaient respectivement inférieures à 5 % et 8 % pour tous les échantillons, indépendamment des droites de régression et des compositions des phases mobiles utilisées. Les résultats ont montré une indépendance en fonction du jour grâce à l'analyse de variance (variance des interdays versus variance intraday) quel que soit l'échantillon considéré. Contrairement aux résultats de justesse, les performances de fidélité de la méthode sont indépendantes du type de phase mobile utilisé.

Concentration en sulfate de sodium		150 mM					37 mM				
Echantillon				120	480	Echantillon			120	480	
$\mu\text{g/mL}$	30	80	400	Umuline®	Insuman®	$\mu\text{g/mL}$	30	80	400	Umuline®	Insuman®
ax+b											
Moyenne $\mu\text{g/mL}$	29,3	80,8	387,2	127,0	540,1	Moyenne $\mu\text{g/mL}$	29,2	80,5	400,2	119,4	511,7
CV_r	2,05	4,06	1,98	3,93	1,91	CV_r	1,97	1,74	1,57	3,42	2,26
CV_{IP}	7,51	4,06	7,76	3,93	4,87	CV_{PI}	3,07	1,75	1,57	5,37	2,87
ax+0											
Moyenne $\mu\text{g/mL}$	29,2	80,7	387,2	126,9	540,1	Moyenne $\mu\text{g/mL}$	29,6	80,8	400,2	119,7	511,6
CV_r	2,05	4,05	1,97	3,92	1,91	CV_r	1,94	1,73	1,57	3,41	2,25
CV_{IP}	2,42	4,64	7,74	3,92	4,85	CV_{IP}	6,49	2,12	1,57	6,31	2,84
Ax											
Moyenne $\mu\text{g/mL}$	29,3	81,0	388,4	127,3	541,8	Moyenne $\mu\text{g/mL}$	29,6	80,8	400,2	119,8	511,8
CV_r	2,06	4,07	1,98	3,93	1,91	CV_r	1,94	1,72	1,57	3,38	2,26
CV_{IP}	2,48	5,11	7,71	3,93	4,90	CV_{IP}	6,75	2,33	1,57	6,92	3,59

Tableau 7 : Données de validation de méthode en termes de fidélité

La fidélité a été déterminée sur 3 jours avec 3 déterminations par jour, CV en %.

5.1.4 Discussion

L'objectif de cette étude était de valider la méthode de quantification de l'insuline décrite dans la monographie de la Pharmacopée Européenne après une réduction de la quantité de sels de la phase mobile. Ainsi, nous avons montré qu'une phase mobile contenant du sulfate de sodium 37 mM constitue à tous les égards une bonne alternative à la phase mobile précédemment utilisée contenant du sulfate de sodium 148 mM, préservant ainsi l'intégrité des pompes et des joints de la chaîne chromatographique (aucune surpression du système n'a été observée avec la phase mobile moins concentrée). De plus, l'utilisation d'une courbe d'étalonnage en un point, entièrement validée, permet un gain de temps non négligeable comparé à l'étalonnage en cinq points. Cette méthode peut donc être appliquée à la

quantification de l'encapsulation d'insuline dans nos systèmes de nanoparticules de PLGA avec une sélectivité et une sensibilité suffisantes. Cette nouvelle méthode d'analyse a été rédigée et soumise pour publication à *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*.

Afin de faire valider cette méthode après modification de la quantité de sels, une procédure de révision peu être proposée à la comission de la pharmacopée Européenne (Annexe C).

5.2 Impact de la charge de surface des NPs d'insuline

5.2.1 Contexte de l'étude

L'encapsulation de bio-médicament par des systèmes nanoparticulaires à base de PLGA est aujourd'hui une technique très répandue notamment pour l'administration orale d'insuline (Danhier *et al.*, 2012; Malathi *et al.*, 2015; Sheng *et al.*, 2015). En effet, l'encapsulation possède l'avantage d'être à la fois biocompatible mais également de pouvoir allier plusieurs stratégies de protection de principe actif comme le greffage, l'utilisation de promoteurs d'absorption ou encore d'inhibiteurs d'enzyme. De plus, leurs paramètres physico-chimiques peuvent être modulés. En effet, certaines études ont montré une faible biodisponibilité pour ce type de système (Sonaje *et al.*, 2010). C'est pourquoi dans le but d'augmenter l'efficacité de ces systèmes, nous nous sommes intéressés à l'impact de leurs paramètres physicochimiques.

En effet, la taille, la stabilité et la charge de surface des NPs peuvent affecter les capacités d'absorption de celles-ci (Bakhru *et al.*, 2013; Foged *et al.*, 2005; Vasir *et al.*, 2008). En ce qui concerne la taille, de nombreuses études ont montré divers mécanismes d'internalisation variant en fonction de la taille des NPs (Verma *et al.*, 2010). En revanche, les études sur la charge de surface sont rares. Pour étudier leur impact sur l'efficacité des systèmes nanoparticulaires, différentes approches existent, y compris la mucoadhésion. La mucoadhésion est un processus par lequel un polymère mucoadhésif enrobé (Diop *et al.*, 2015; Nafee *et al.*, 2007) permet l'interaction entre les particules et la couche de mucus intestinal, améliorant ainsi l'absorption et la biodisponibilité de l'insuline encapsulée (Shakweh *et al.*, 2004). Les effets de ces polymères sont liés à leur forte charge positive (Plapied *et al.*, 2010; Shakweh *et al.*, 2004) et ont montré une augmentation du transport paracellulaire avec des promoteurs d'absorption tels que le chitosan favorisant les interactions avec la charge négative des cellules du mucus intestinal. De même, Diop *et al.* (2015) ont démontré la capacité des NPs de chitosan, chargées positivement, à franchir la barrière intestinale dans les cellules Caco-2 (Diop *et al.*, 2015). La deuxième stratégie pour améliorer la biodisponibilité avec modification de la charge de surface implique la stabilisation du polymère. Grabowski *et al.* ont prouvé que les NPs de PLGA chargées négativement avec un stabilisateur, le pluronic® F68, influencent les profils d'absorption, de cytotoxicité et de biodisponibilité des NPs, améliorant ainsi l'internalisation (Grabowski *et al.*, 2013). De même,

Yu *et al.* (2015) ont démontré que les NPs de PLGA avec une surface chargée négativement, formulées sans aucun stabilisant, ont montré une bonne efficacité biologique. Au vu de ces études très controversées, notre but a donc été de comparer différentes charges de surface pour des NPs de PLGA afin d'évaluer l'impact de ce paramètre sur la stabilité, l'absorption *in vitro* et finalement l'efficacité *in vivo* au sein du système de double encapsulation.

5.2.2 Caractérisation physico-chimique des NPs

Pour cette étude, cinq types de nanoparticules ont été développés : les nanoparticules formulées avec de l'alcool polyvinylique (+PVA), sans surfactant (-PVA), avec du dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou les nanoparticules recouvertes de chitosan, formulées sans surfactant (chitosan) ou avec du SDS (SDS-chitosan).

Dans un premier temps, ces différents types de nanoparticules ont été caractérisées d'un point de vue physicochimique (morphologie, taille, d'homogénéité en taille représentée par l'indice de polydispersité (PDI), charge de surface appelée potentiel zêta et efficacité d'encapsulation (EE)).

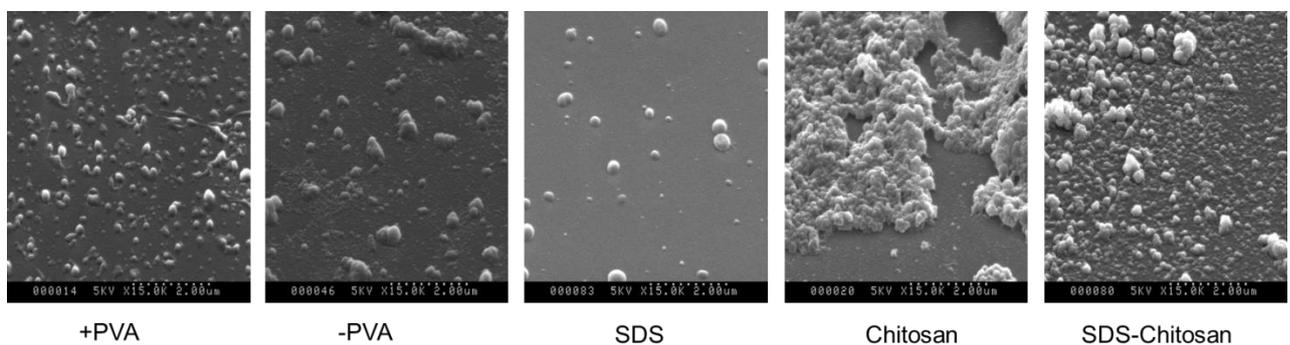


Figure 60 : Morphologie des NPs par microscopie électronique à balayage (MEB)

La morphologie a été réalisée sur les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan. Barre d'échelle = 2 μ m.

La taille moyenne mesurée par diffusion dynamique de la lumière a montré pour les NPs +PVA une taille de 188 \pm 2 nm avec un potentiel zêta neutre (-2 \pm 1 mV). L'élimination du surfactant (-PVA NPs) entraîne une diminution de taille à 168 \pm 8 nm, une bonne homogénéité avec un PDI<0,3 et une charge de surface quant à elle négative (-22 \pm 1 mV). Ces résultats ont été confirmés avec l'observation au MEB qui a montré une forme sphérique et une taille homogène pour ces deux types de NPs (Figure 59).

Après l'incorporation d'un tensio-actif tel que le SDS, la taille des NPs a été légèrement diminuée (151 ± 4 nm) et la charge de surface est fortement négative (-42 ± 2 mV). L'observation microscopique montre que les NPs ont une forme sphérique, une taille réduite et présentent une bonne homogénéité (Figure 59).

Le recouvrement des NPs au chitosan n'a pas eu d'impact sur la taille des NPs (162 ± 4 et 184 ± 4 nm) respectivement pour les NPs de chitosan et de SDS-chitosan mais a fait apparaître une charge de surface positive (56 ± 2 et 40 ± 1 mV) (Tableau 8) comme attendu. L'efficacité d'encapsulation (EE) était proche de 100 % pour toutes les formulations sauf pour les NPs de chitosan avec une diminution significative de l'EE à 34 ± 11 % ($P < 0,05$) (Tableau 1). L'analyse au MEB des NPs (Figure 59) a montré une taille homogène et une morphologie arrondie pour les particules +PVA, -PVA et SDS. En revanche, avec le recouvrement au chitosan, une agrégation a été observée avec une conformation en réseau (Figure 59) et une polydispersité de la taille des NPs confirmée avec un Pdl autour de 0,3 plus élevé que pour les autres NPs. Ce phénomène n'a pas été observé avec les NPs SDS-chitosan, qui ont semblé être plus stables avec tout de même une morphologie modifiée des NPs comparée aux NPs +PVA, -PVA et SDS (Figure 59).

	NPs +PVA	NPs - PVA	NPs SDS	NPs +PVA recouvertes de chitosan	NPs SDS recouvertes de chitosan
Taille (nm)	188 ± 2	168 ± 8	151 ± 4	162 ± 4	184 ± 4
Pdl	$0,16\pm 0,01$	$0,23\pm 0,02$	$0,19\pm 0,02$	$0,27\pm 0,01^a$	$0,15\pm 0,02$
Potentiel ζ (mV)	-2 ± 1	-22 ± 1^a	-42 ± 2^a	56 ± 2^a	40 ± 1^a
EE (%)	100 ± 0	100 ± 0	86 ± 6	34 ± 11^a	92 ± 10

Tableau 8 : Paramètres physico-chimiques des différents types de nanoparticules

La caractérisation a été réalisée sur les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan. Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (taille, Pdl et potentiel zêta) et l'efficacité d'encapsulation a été déterminée. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type ($n=3$). Toutes les données ont été comparées aux NPs +PVA. La significativité était fixée à $p < 0,05$ vs. NPs + PVA ($n=3$).

5.2.3 Stabilité des NPs dans le temps

Les paramètres physico-chimiques ont été mesurés pendant 21 jours afin de tester la stabilité des nanoparticules dans le temps, conservées à 4°C.

Cette étude de stabilité nous montre que toutes les formulations de NPs chargées d'insuline étaient stables (taille et charge) à 4°C pendant 21 jours (Figures 60A et 60B), hormis une diminution de la taille des NPs de chitosan après 7 jours (Figure 2A) et une légère diminution de la charge négative des NPs SDS.

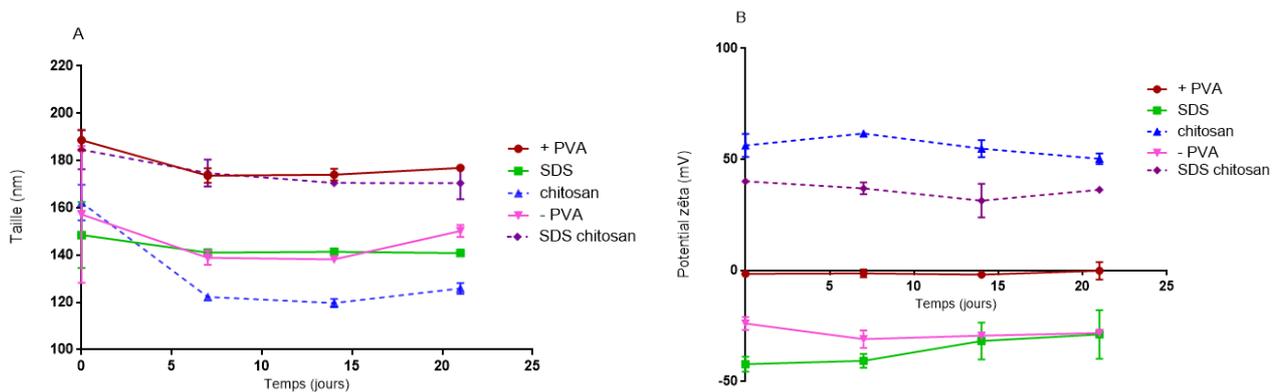


Figure 61 : Stabilité des paramètres physico-chimiques dans le temps

La caractérisation a été réalisée sur les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan tous les 7 jours pendant 21 jours. Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière sur la taille (A) et le potentiel zêta (B). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type ($n=3$).

5.2.4 Stabilité des NPs en milieux simulés

La stabilité des NPs a été testée en milieux simulés (Figure 3). Les NPs +PVA ont montré une libération importante d'insuline encapsulée dans le milieu simulé gastrique et intestinal après 4 heures d'incubation confirmée avec un délitement observé au MEB (Figure 61) en milieu intestinal. Pour les NPs formulées sans PVA, nous avons observé une libération équivalente de l'insuline à environ 60-70 % dans le milieu intestinal après 4 heures (Figure 3B). Les NPs SDS ont montré une faible libération d'insuline dans les conditions gastriques (30-40 % de l'insuline libre) par rapport aux autres NPs (Figure 3A). Cependant, dans les conditions intestinales, une libération importante est à noter après seulement 30 minutes.

Pour les NPs enrobées de chitosan, environ 50 % et 75 % de l'insuline a été libérée dans les conditions gastriques et intestinales respectivement, après 4 heures. L'observation des NPs nous montre une agrégation massive des NPs principalement en milieu intestinal (Figure 4). L'incorporation de chitosan dans les NPs formulées avec du SDS comme surfactant a provoqué un retard de libération de l'insuline dans le milieu gastrique après 30 minutes par rapport aux

particules recouvertes de chitosan formulées avec du PVA (25 % contre 60 %). En revanche, une augmentation de l'insuline libérée atteignant 75 % a été observée dans les conditions intestinales après 4 heures (figure 61) ainsi qu'une agrégation comme pour les NPs chitosan formulées avec du PVA (Figure 62).

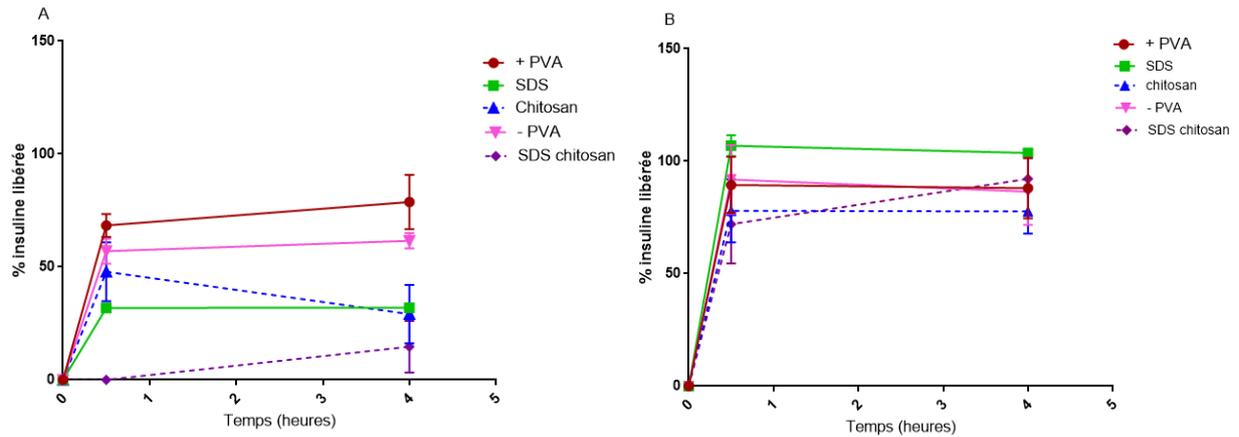


Figure 62 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieux simulés

Le pourcentage d'insuline libérée a été déterminé pour les + NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan en milieu gastrique (A) (pH = 1,2) et intestinal (B) (pH = 7,4) pendant 4 heures. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37 °C. La quantité d'insuline libérée a été déterminée par HPLC en utilisant la monographie de la pharmacopée Européenne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n ≥ 3)

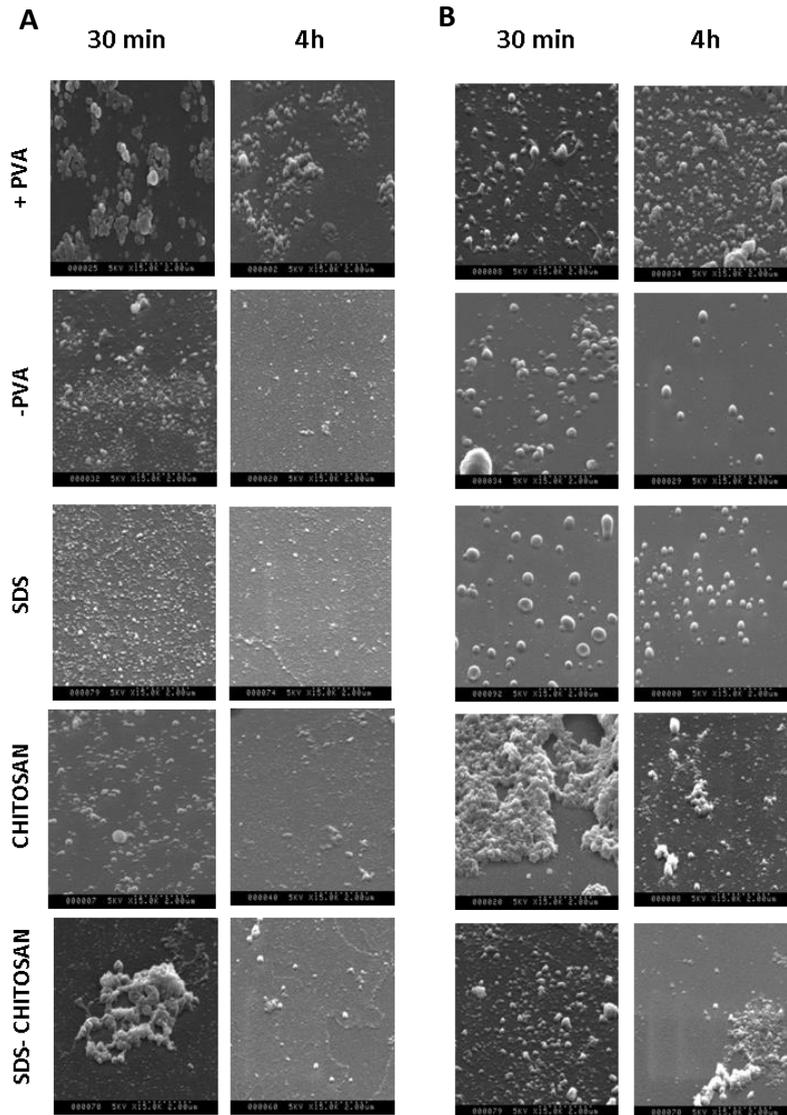


Figure 63 : Morphologie des différents types de NPs par microscopie électronique à balayage (MEB) en milieux gastrique et intestinal simulés

La morphologie des NPs a été observée pour les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan en milieu gastrique (A) (pH=1,2) et intestinal (B) (pH=7,4) pendant 4 heures. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37 °C.

5.2.5 Toxicité *in vitro* des NPs

Par rapport aux cellules sans traitement, aucune toxicité n'a été observée dans les deux modèles de culture cellulaire, Caco-2 et Caco-2/HT29MTX (co-culture). En effet, l'incubation des NPs sur les cellules pendant 4 heures n'induit pas de diminution significative de la viabilité cellulaire indépendamment du type de NPs testé (Figure 5A et 5B) excepté une diminution de la viabilité des cellules co-cultivées traitées avec des NPs SDS-chitosan ($P < 0,05$) (Figure 63A).

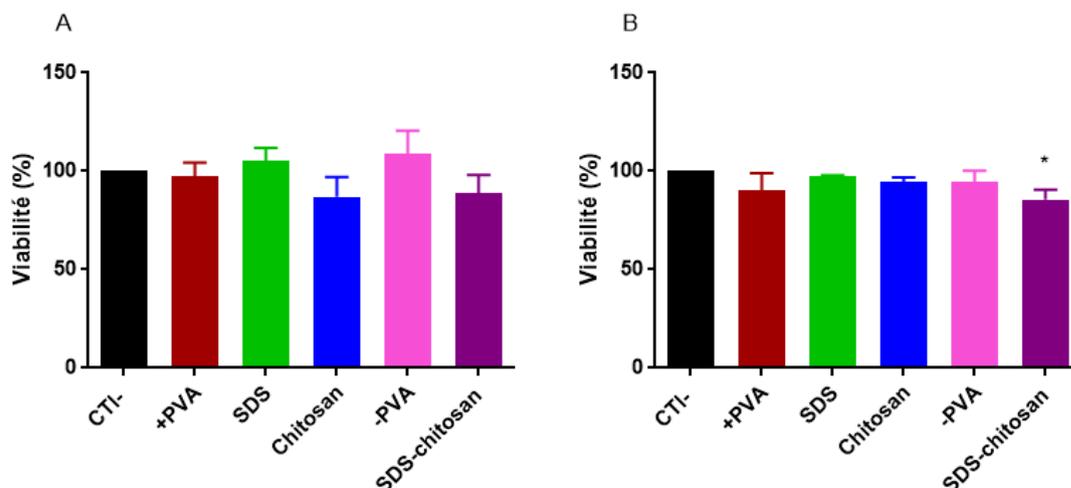


Figure 64 : Pourcentage de viabilité cellulaire

La viabilité a été mesurée par la technique MTS après incubation des différentes NPs, les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan sur les deux modèles cellulaires Caco-2 (A) et co-culture Caco-2/RevHT29 MTX (B). Les cellules sans incubation étaient utilisées comme contrôle positif et défini à 100 % de viabilité. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM. Toutes les données ont été comparées au contrôle négatif. La significativité était fixée à $p < 0,05$ vs. contrôle négatif ($n \geq 3$).

5.2.6 Effet *in vitro* des NPs sur les jonctions serrées

Aucun changement significatif n'a été observé en termes de TEER 5 heures après incubation avec des NPs SDS (89 ± 3 , 75 ± 7 %), NPs + PVA (85 ± 4 , 75 ± 6 %) et NPs -PVA (79 ± 6 , 65 ± 9 %) par rapport aux cellules sans NPs (88 ± 3 , 81 ± 11 %) sur les deux modèles cellulaires Caco-2 et de co-culture, respectivement (Figures 64A et 64B). En revanche, pour les NPs de chitosan et SDS-chitosan, une diminution forte et significative de la TEER a été observée sur les modèles Caco-2 (32 ± 13 , 31 ± 14 %, $P < 0,01$) et Caco-2/RevHT29-MTX (30 ± 14 , 30 ± 13 %, $P < 0,01$) comparé au contrôle négatif sans NPs. Les valeurs obtenues avec des NPs recouvertes de chitosan étaient comparables à celles de l'EGTA, utilisé comme contrôle positif, indiquant l'ouverture des jonctions serrées (Figure 64).

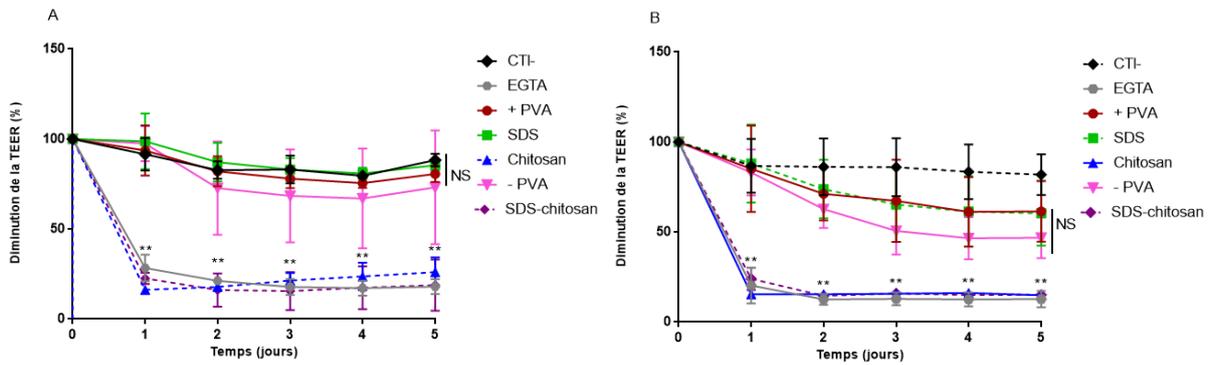


Figure 65 : Pourcentage de diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) des cellules comparé à la valeur initiale

La TEER a été mesurée après incubation des différentes NPs, les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan sur les deux modèles cellulaires, Caco-2 (A) et Caco-2/Rev HT29MTX (B). L'EGTA a été utilisé comme contrôle positif d'ouverture des jonctions serrées. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Toutes les données ont été comparées au contrôle négatif. La significativité était fixée à $p < 0,01$ vs. contrôle négatif ($n \geq 3$).

5.2.7 Absorption intestinale des NPs *in vitro*

Une augmentation de la fluorescence associée aux cellules pour tous les types de NPs a été observée comparée au contrôle négatif dans les deux modèles de culture cellulaire. Cependant, cette augmentation est significative uniquement pour les NPs SDS ($P < 0,01$), chitosan ($P < 0,05$) et SDS-chitosan ($P < 0,05$) (Figure 7A). Cette fluorescence associée des différents types de NPs a ensuite été comparée aux NPs de référence c'est-à-dire sans charge de surface (NPs + PVA). Pour le modèle cellulaire Caco-2, une plus forte fluorescence a été observée dans les cellules incubées avec des NPs contenant du SDS ($P < 0,05$) (figure 65A). Contrairement aux autres types de particules, les NPs SDS (1787 ± 407 , $P < 0,05$) ont montré une augmentation significative de la fluorescence par rapport à + PVA (1277 ± 225). De même, en co-culture, les NPs SDS ont montré une augmentation de la fluorescence associée par rapport au contrôle négatif ($P < 0,05$) (Figure 65B).

Pour les NPs sans PVA, dans les 2 modèles de culture cellulaire, aucune augmentation de la fluorescence n'a été observée par rapport aux NPs + PVA (Figures 65A et 65B). De même, dans le modèle de co-culture, aucune augmentation de la fluorescence n'a été observée pour tous les types de NPs comparée aux NPs +PVA, à l'exception d'une tendance à la significativité pour les NPs SDS ($P=0,08$).

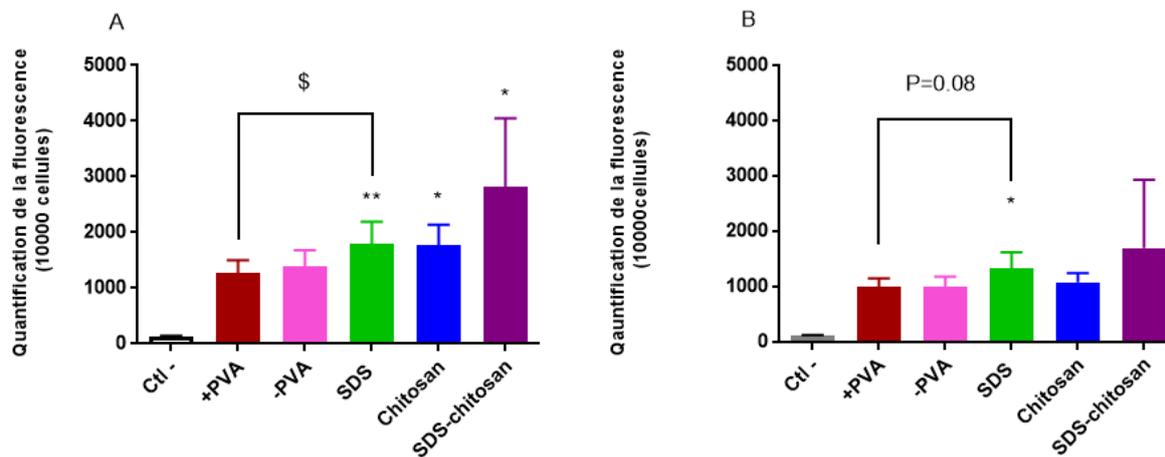


Figure 66 : Quantification de la fluorescence associée aux cellules

La quantification de la fluorescence a été réalisée par cytométrie en flux après incubation des différentes NPs, les NPs +PVA, les NPs -PVA, les NPs SDS, les NPs chitosan et les NPs SDS-chitosan sur les deux modèles cellulaires, Caco-2 (A) et Caco-2/Rev HT29MTX (B) où 10000 événements ont été enregistrés. Les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence \pm SEM. Toutes les données ont été comparées au contrôle négatif et aux NPs +PVA. La significativité était fixée à * $p < 0,05$ vs. contrôle négatif, ** $p < 0,01$ vs. contrôle négatif, and * $p < 0,05$ vs. NPs +PVA ($n=6$).

5.2.8 Caractérisation des véhicules gastro-résistants

La figure 66A représente les véhicules gastro-résistants d'alginate observés par microscopie électronique à balayage (MEB). On peut observer que les véhicules ont une forme sphérique, une surface lisse ainsi qu'une taille homogène.

Sur les Figures 66B et 66C sont représentés les véhicules gastro-résistants en milieux simulés. On peut ainsi observer que ceux-ci restent intacts après deux heures d'incubation en milieu gastrique mais en revanche se délitent après seulement 30 minutes en milieu intestinal libérant ainsi les NPs de PLGA contenues à l'intérieur.

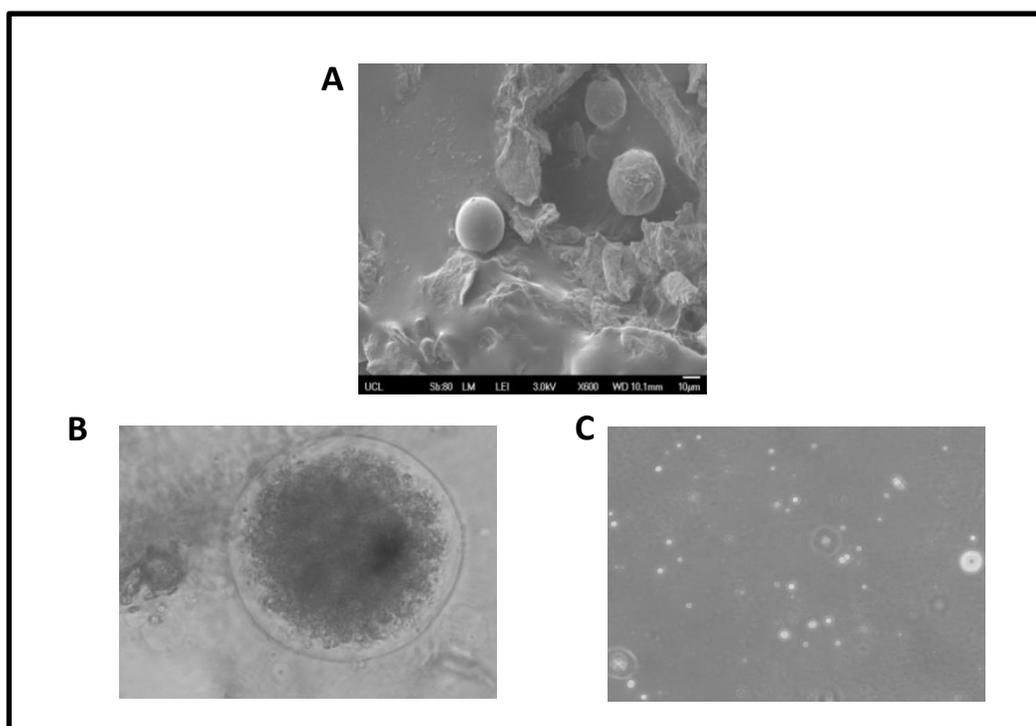


Figure 67 : Morphologie des véhicules gastro-résistants d’alginate par microscopie électronique à balayage (MEB)

La morphologie des véhicules gastro-résistants a été observée sans incubation (A) et après incubation en milieux simulés gastrique (B) pendant deux heures et intestinal (C) pendant 30 minutes.

5.2.9 Validation *in vivo* des nanoparticules

Pour toutes les conditions, une diminution de la glycémie a été observée sur les 18 heures de suivi (Figure 67). L'administration orale du vecteur complexe (NPs SDS avec véhicule gastro-résistant d’alginate) a induit une diminution significative des taux de glucose sanguin chez les rats diabétiques par rapport aux véhicules contenant des NPs vides utilisés comme contrôle négatif, à partir de 12 heures. Comparée à l'insuline libre, cette diminution dépendait de la concentration avec une diminution plus importante pour une concentration de 250 UI/kg à partir de 12 heures ($P < 0,005$) qu'avec une concentration de 100 UI/kg à partir de 14 heures ($P < 0,01$). (Figure 67).

L'injection d'insuline par voie intrapéritonéale a montré une diminution rapide de la glycémie dès 30 minutes jusqu'à une normoglycémie atteinte à deux heures.

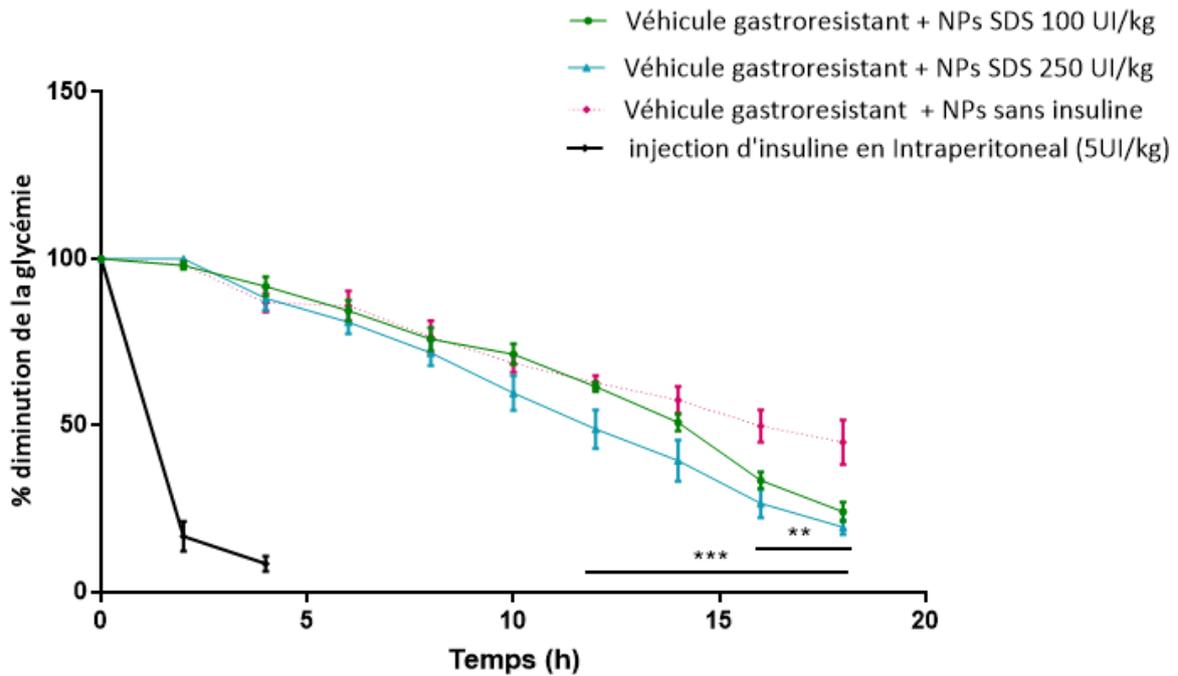


Figure 68 : Evolution de la glycémie des rats diabétiques

La glycémie a été mesurée après administration par voie orale des NPs SDS à une dose de 100 or 250 UI/kg ou de NPs vides ou une injection intrapéritonéale d'insuline (5UI/kg) (n=3). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les NPs sans insuline ont été utilisées comme contrôle négatif. Tous les résultats ont été comparés à ce groupe. La significativité était fixée à, $p < 0,01$ vs. NPs sans insuline, $p < 0,005$ vs. NPs sans insuline (n \geq 6).

Le dosage d'insuline humaine dans les prélèvements de sang des rats après gavage avec les NPs SDS, nous montre une augmentation de l'insulinémie après 4 heures de suivi pour les conditions NPs SDS 100 et significative pour une concentration 250 UI/kg ($P < 0,005$). En revanche, pour les rats gavés avec des véhicules contenant des NPs vides utilisés comme contrôle négatif, l'insulinémie est restée basse durant le suivi de 18 heures. A 8 heures, l'insulinémie diminue pour les deux conditions mais reste élevée comparée au contrôle négatif. En revanche, à 12h et à 16h, la quantité d'insuline retrouvée diminue fortement pour les deux concentrations en NPs SDS (Figure 68).

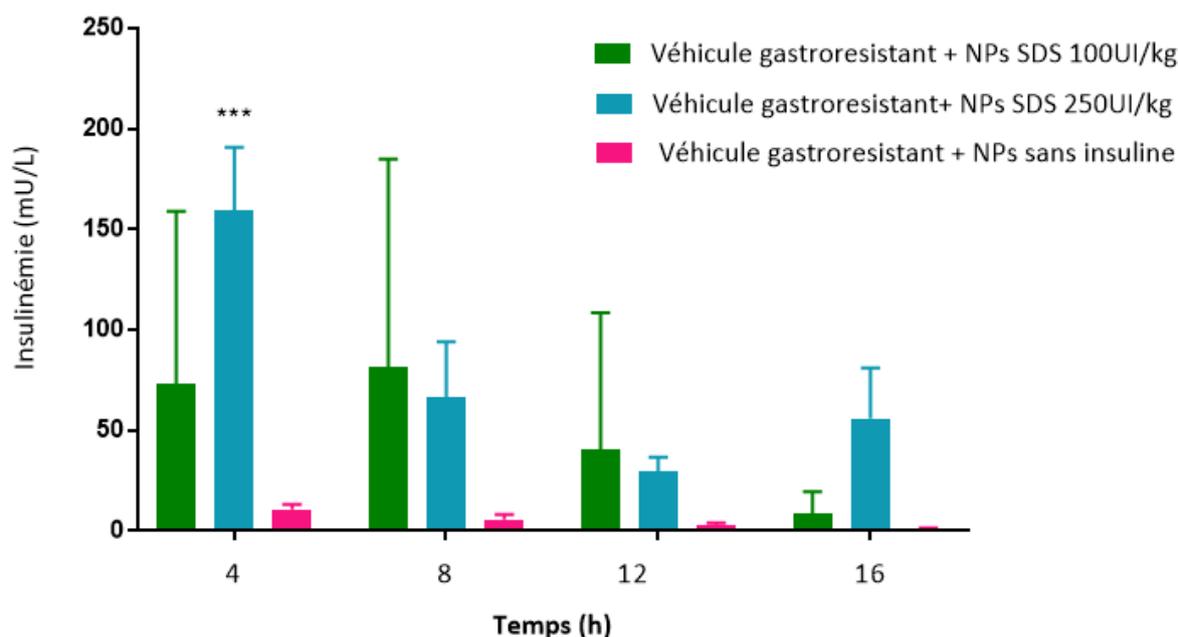


Figure 69 : Evolution de l'insulinémie des rats diabétiques

L'insulinémie a été mesurée après administration par voie orale des NPs SDS à une dose de 100 or 250 UI/kg ou des NPs sans insuline. Le dosage a été effectué par méthode ELISA à différents temps, t4, t8, t12 et t16h. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. La significativité était fixée à $p < 0,005$ vs. NPs sans insuline ($n \geq 6$).

5.2.10 Discussion

Le but de cette étude était de tester l'impact de la modification de la charge de surface des NPs encapsulant l'insuline sur l'efficacité du système. Les NPs ont été formulées à base de PLGA puis stabilisées par des surfactants. Le PLGA a quant à lui été choisi pour sa biocompatibilité. En effet, il a l'avantage de s'hydrolyser en milieu sanguin en se décomposant en acide lactique et acide glycolique qui sont ensuite métabolisés par le cycle de Krebs (Danhier *et al.*, 2012).

Dans le but d'obtenir des NPs de charges différentes, différentes formulations ont été développées : des NPs stabilisées par le PVA présentant une charge de surface neutre, considérées comme les NPs de référence (Reix *et al.*, 2012b), des NPs stabilisées ou non par le PVA et chargées positivement grâce au recouvrement par le chitosan, un polymère cationique, des NPs non stabilisées chargées faiblement négativement en enfin des NPs stabilisées par le PVA en présence de SDS présentant une charge de surface fortement négative.

Les différentes formulations de NPs ont été caractérisées ce qui a permis de montrer que les NPs d'un diamètre de 200 nm et de charges dépendantes de la formulation étaient stables au cours du temps (21 jours).

En ce qui concerne le recouvrement des NPs par le chitosan, celui-ci a procuré aux NPs une charge positive. Ce recouvrement peut être expliqué par des interactions électrostatiques entre les groupements amine (NH_3^+) et les groupements carboxyliques (COO^-) du PLGA (Zhou *et al.*, 2010). Comme le chitosan est un polymère pH-dépendant et chargé positivement uniquement à pH faible ($\text{pH} < 5,5$) (Duceppe *et al.*, 2009; Szymanska *et al.*, 2015), ces interactions en milieu gastrique sont stables, le recouvrement est donc optimal. C'est pourquoi une faible libération d'insuline a été observée confirmant l'étude de Lopes *et al.*, 2016. Cependant cette résistance en milieu gastrique ne soustrait pas l'utilisation de la double encapsulation qui permet de limiter les pertes de principe actif au maximum.

A l'opposé, à des pH neutres 7,2 (eau milliQ et milieu biologique), la charge du chitosan change créant la déstabilisation du système nanoparticulaire traduite par une agrégation des NPs, un Pdl élevé et une faible efficacité d'encapsulation. Les variations de tailles peuvent également être imputées à un gonflement ou un rétrécissement des NPs (Lopes *et al.*, 2016) perturbant les interactions entre PLGA et chitosan.

De ce fait, afin de stabiliser ces NPs recouvertes de chitosan, un surfactant anionique, le SDS a été ajouté à la formulation. L'idée était de créer des interactions électrostatiques entre le chitosan (+) et le SDS (-) afin d'obtenir un système de NPs plus stable et chargé positivement (NPs SDS-chitosan). D'un point de vue physico-chimique, ce système a montré une faible distribution en taille (Pdl) et une bonne efficacité d'encapsulation comparée aux NPs de chitosan formulées sans surfactant prouvant ainsi l'impact de l'ajout du SDS sur la stabilité des NPs.

L'internalisation de ces deux types de NPS a été validée sur des modèles de culture cellulaire intestinaux. Les Caco-2 et les HT29 MTX sont des cellules permettant de mimer *in vitro* la barrière intestinale (Schimpel *et al.*, 2014) ayant à la fois des enzymes métaboliques typiques ainsi que des transporteurs d'efflux et la capacité de sécréter du mucus, respectivement.

Cette charge positive empêche une internalisation correcte des NPs recouvertes de chitosan puisque nous avons montré un signal fluorescent faible avec une variabilité très importante

ainsi qu'une chute de la TEER. Combinés, ces résultats montrent que le passage de ce type de NPs se fait par un mécanisme de type paracellulaire. En effet, même si les NPs positivement chargées pourraient utiliser un mécanisme transcellulaire par la voie endocyttaire (Bannunah *et al.*, 2014), le chitosan présent à la surface des NPs perturbe les jonctions serrées permettant leur passage à travers la barrière intestinale. En effet, ce composé est connu pour son effet sur l'ouverture des jonctions serrées grâce à la translocation des protéines de ce type de jonction de la membrane au cytosquelette (Smith *et al.*, 2004) confirmant ce mécanisme paracellulaire. Mais cette ouverture des jonctions pourrait se révéler être toxique à long terme (Smith *et al.*, 2004), particulièrement dans le cas de l'utilisation de ces NPs dans le traitement de maladie chronique. De plus, il semble que les NPs adhèrent au mucus présent à la surface des cellules, comme montré par la présence de fluorescence. Il est vrai que le chitosan possède de fortes propriétés mucoadhésives augmentant ainsi le temps de contact entre la couche intestinale recouverte de mucus et les NPs recouvertes (Lopes *et al.*, 2014). De plus, les interactions électrostatiques entre les charges positives des NPs et la membrane cellulaire négativement chargée par la présence de protéoglycanes, à la surface (Boddupalli *et al.*, 2010) pourraient donc être fortes et empêcher l'internalisation des NPs (Sheng *et al.*, 2015).

En parallèle, des NPs chargées négativement ont également été formulées par deux méthodes. La première consistant à enlever le surfactant (NPs sans PVA) et la seconde à utiliser un surfactant chargé négativement : le SDS (NPs SDS). La suppression du surfactant a été suggérée par notre partenaire industriel pour lequel la limitation de l'utilisation de ce type de composé est cruciale afin de limiter la toxicité sur des traitements chroniques (Sekhon, 2013). En l'absence de surfactant à la surface des NPs, nous avons ainsi observé une charge faiblement négative due à l'hydrolyse du PLGA en milieu aqueux (Gentile *et al.*, 2014). En termes de stabilité, de manière surprenante, l'absence de tensioactif n'affecte pas les caractéristiques physico-chimiques des NPs (taille et Pdl faibles). Cette stabilité pourrait être expliquée par la présence de Pluronic® F68 présentant de bonnes propriétés tensioactives (Santander-Ortega *et al.*, 2009). Le F68 pourrait être présent en excès au sein de la première émulsion où il joue le rôle de tensioactif stabilisant l'émulsion eau dans huile. Ainsi, la quantité de Pluronic® F68 non utilisée pour stabiliser la première émulsion pourrait permettre de stabiliser la seconde émulsion où aucun surfactant n'est ajouté stabilisant le système complet.

De plus, le Pluronic® F68 possédant une HLB>24, a la capacité de stabiliser une émulsion huile dans eau (Li *et al.*, 2013), correspondant à la seconde émulsion. Nous avons confirmé cette hypothèse avec l'utilisation d'insuline concentrée (Insuman® 400 UI/mL, données non présentées). Dans ce cas le F68 n'était plus en excès par rapport à la phase aqueuse, il a donc été recruté complètement pour la stabilisation de la première émulsion. Lors de la seconde émulsion aucun surfactant n'était donc disponible ce qui a entraîné l'agrégation des NPs.

De manière surprenante les charges des NPs n'étaient que faiblement négatives alors que dans le cas d'une hydrolyse du PLGA, nous aurions pu nous attendre à une charge négative des NPs plus nette et importante. Il est fort probable que les charges négatives soient masquées par des interactions électrostatiques entre l'insuline (chargée positivement à pH <5,5) et le PLGA, recrutant des charges et diminuant la négativité des NPs (Danhier *et al.*, 2012). Afin de tester l'effet d'une charge négative plus élevée, nous avons également utilisé du SDS, tensioactif chargé négativement et couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique (Anderberg *et al.*, 1992). Son adsorption se faisant à la surface des NPs grâce à une tête hydrophile chargée négativement permettant une stabilisation des NPs formulées avec celui-ci (Gao *et al.*, 2010).

D'un point de vue biologique, en plus de leur stabilité, aucun effet sur l'intégrité de la barrière épithéliale n'a été observé après exposition de celle-ci aux NPs SDS. L'inquiétude quant à la possible action détergente du SDS sur les cellules et les jonctions a donc été écartée (Qian, 2013). Sans passage paracellulaire, il est fort probable que les NPs utilisent un mécanisme de passage transcellulaire, ce qui est un avantage par rapport aux NPs chitosan.

Un mécanisme transcellulaire par la voie endocytaire (Grabowski *et al.*, 2013) des radeaux lipidiques grâce à la cavéoline par exemple (Bannunah *et al.*, 2014) semble le plus probable. L'internalisation a donc été démontrée comme étant supérieure aux autres NPs. Il serait maintenant intéressant de distinguer l'internalisation de l'adsorption des NPs sur les cellules. Pour cela, il est possible de dissocier la fluorescence extérieure d'une vraie internalisation, Loike *et al.* grâce au quenching du signal par le bleu trypan (Loike *et al.*, 1983). Il conviendrait donc de tester les différents types de NPs sur l'internalisation en présence de bleu trypan. De plus, afin de s'approcher au plus près du modèle *in vivo*, il serait intéressant d'utiliser des cellules M capables de transporter 50 fois plus de NPs que les Caco-2 (Schimpel *et al.*, 2014). En ce sens, un modèle de culture triple *in vitro* (Antunes *et al.*, 2013) ou un système *ex vivo*

utilisant des chambres d'Ussing (Lundquist *et al.*, 2016) pourraient être utilisés afin de confirmer les résultats *in vitro* montrés au sein de cette étude.

Les résultats *in vitro* des NPs chargées négativement formulées avec du SDS nous ont donc permis de valider ces NPs pour l'étude *in vivo*. Pour cela, les NPs ont été administrées oralement chez le rat sur un modèle insulino-pénique. Afin de réaliser cette administration, le système de double encapsulation a été employé composé des NPs enfermées au sein du vecteur gastro-résistant que nous avons développé. Ce vecteur, à base d'alginate, polymère d'origine naturelle et donc biocompatible permet un délitement intestinal (Xie *et al.*, 2017). Techniquement, ce vecteur d'alginate est formulé par gélification ionotropique de l'alginate de sodium en présence d'ions calcium (sous forme de carbonate). Afin de former des billes de taille homogène, les vecteurs ont été formulés par une technique d'émulsion.

L'insuline doublement encapsulée a montré un effet hypoglycémiant chez le rat de manière dose-dépendant avec un premier effet sur la glycémie à 100 UI/kg et un effet plus prononcé à 250 UI/kg. L'effet a été observé pour la première fois après 12 heures et était toujours significatif à 18 heures. Dû à la forte libération d'insuline en milieu intestinal, il a été nécessaire d'utiliser des quantités très importantes en insuline afin d'observer un impact sur la glycémie. La cinétique de libération a été rapide puisque l'insuline était retrouvée dès 4 heures post ingestion mais l'effet sur la glycémie quant à lui n'était observable qu'après 12 heures.

Cet effet retard constaté sur la glycémie peut-être expliqué de différentes façons. Cela pourrait d'une part être attribué à un masquage de l'effet dû à l'effet jeun très important les premières heures que l'on peut constater avec une baisse importante de la glycémie des rats gavés avec des nanoparticules ne contenant pas d'insuline. En effet, la mise à jeun des rats impacte considérablement la glycémie, pouvant être expliquée par un stockage de glycogène moins important due à l'injection de STZ entraînant un faible relargage de glucose à jeun. De plus, le vecteur pourrait retarder la libération des NPs car l'utilisation de capsules gastro-résistantes a montré une libération du principe actif, retrouvé dans le sang seulement deux heures post-ingestion (Reix *et al.*, 2012a). Une autre hypothèse serait due à la motilité intestinale pouvant influencer les délais d'absorption où les NPs doivent atteindre des régions spécifiques et propices de l'intestin à l'absorption de l'insuline. En effet, il a été rapporté que le jéjunum et l'iléon ont une perméabilité apparente 2 à 15 fois supérieure à celle des autres segments du tractus intestinal, où il existe d'abondantes colonies de plaques de Peyer

(Agarwal *et al.*, 2001) où l'absorption pourrait donc y être favorisée. On pourrait également l'expliquer par les propriétés mucoadhésives liées à la charge des NPs pouvant influencer la vitesse de passage également. Iwanaga *et al.* ont montré que l'effet hypoglycémiant des liposomes perdurait lorsqu'ils modifiaient la surface par le poly (oxyde d'éthylène) (PEO), qui présente une forte affinité pour la couche muqueuse de l'intestin grêle (Iwanaga *et al.*, 1999). Ce composant est présent dans le Pluronic® F68, utilisé dans notre formulation. Ces données pourraient également expliquer l'effet à long terme de l'insuline liée au système de NPs (Agarwal *et al.*, 2001), comme un modèle d'insuline retard.

Enfin, la rapidité de passage transcellulaire peut bien sûr impliquer des délais d'action. Reix *et al.* ont démontré que les NPs sont encore présentes dans les cellules Caco-2, 4 heures après leur absorption et co-localisées avec les membranes cellulaires latérales (Reix *et al.*, 2012b). Au sein de notre modèle, l'effet retard observé est d'une part masqué par le jeun confirmé par l'insuline retrouvée dans le sang après 4 heures. Ces 4 heures peuvent quant à elles être expliquées par l'addition à la fois du temps de libération des NPs du vecteur gastro-résistant mais également le temps d'internalisation des NPs d'environ 4 heures également. Après 16 heures, peu d'insuline est retrouvée mais l'effet jeun ayant disparu un effet sur la glycémie apparaît tout de même.

En conclusion, la présence de charge négative de surface sur notre système de NPs a montré son importance à la fois sur la non toxicité du système mais a permis également d'améliorer l'internalisation des NPs au niveau intestinal permettant de montrer une efficacité *in vivo* du système complet de double encapsulation chez le rat diabétique.

En revanche, malgré l'efficacité prouvée du système complet, la perte conséquente d'insuline en milieu intestinal ne nous permet pas aujourd'hui de réduire considérablement les quantités d'insuline à administrer par voie orale et d'augmenter significativement la biodisponibilité du principe actif.

5.3 Impact de la libération d'insuline en conditions intestinales

5.3.1 Contexte de l'étude

Le système nanoparticulaire a été optimisé et validé *in vivo* au sein du système de double encapsulation. Ainsi nous avons obtenu un système stable dans le temps d'un point de vue

physico-chimique, internalisé *in vitro* et efficace *in vivo*. En revanche, une instabilité en milieux simulés a été constatée. En effet, les études de stabilité ont montré une perte importante d'insuline en milieux simulés gastrique et intestinal pour tous les types de nanoparticules. Cette forte libération s'associe à une perte importante de principe actif qui pourrait fortement diminuer la biodisponibilité et par conséquent la bioefficacité du système.

Afin de protéger le système nanoparticulaire du milieu gastrique, le système de double encapsulation et son vecteur gastro-résistant entrent en jeu et permettent donc d'empêcher la dénaturation des nanoparticules en milieu gastrique, nanoparticules étant protégées par le vecteur pharmaceutique gastrorésistant. En revanche, pour l'instabilité des nanoparticules de PLGA en milieu intestinal et la perte importante d'insuline associée, d'autres stratégies doivent être mises en place. Afin d'appuyer ces données, plusieurs études ont montré une libération importante de principe actif à un pH proche de 7 dans des systèmes d'encapsulation. En effet Cheng *et al.*, suggèrent une libération importante d'insuline en milieu intestinal due au pH de celui-ci proche du pH sanguin (Chen *et al.*, 2018). Cette libération d'insuline pourrait être associée à l'hydrolyse du polymère à un pH proche de 7 qui entraînerait alors une libération du principe actif.

L'objectif de cette étude est donc d'élaborer différentes stratégies d'optimisation du système nanoparticulaire avec comme objectif de réduire cette perte de principe actif en milieu intestinal puis de tester à la fois d'un point de vue physico-chimique, *in vitro* et enfin *in vivo* l'efficacité du système une fois optimisé.

5.3.2 Première stratégie : impact du type et de la quantité de polymère (PLGA)

La première stratégie mise en place a consisté à formuler les différentes nanoparticules en variant la composition du polymère. L'objectif était de rester sur la même base de polymère, le PLGA, mais de modifier son ratio en monomères.

5.3.2.1 Caractérisation physico-chimique des NPs

La taille moyenne mesurée par diffusion dynamique de la lumière présentée dans le tableau 9, a montré pour les NPs standards (+PVA dans l'étude précédente) c'est-à-dire formulées avec 200 mg de PLGA, une taille d'environ 200 nm (196 ± 25 nm), un Pdl faible ($0,14 \pm 0,08$) et un potentiel zêta neutre ($-0,7 \pm 3,3$ mV) traduisant une monodispersité. L'augmentation de la concentration de PLGA dans la formulation de NPs avec une quantité de 500 mg a montré une

augmentation de la taille des NPs à 275 ± 7 nm et une légère augmentation du Pdl ($0,25 \pm 0,07$) avec une charge de surface proche de la neutralité mais relativement variable ($-5,2 \pm 9,8$ mV). Pour les NPs formulées avec du PLGA 75:25, la taille était plus importante que pour les NPs standards (211 ± 21 nm) avec une charge de surface neutre ($-1,6 \pm 2,2$ mV).

	NPs 200mg PLGA 50:50	NPs 500mg PLGA 50:50	NPs 200mg PLGA 75 : 25
Taille (nm)	196±25	275±7	211±21
Pdl	0,14±0,08	0,25±0,07	0,18±0,05
Potentiel-ζ (mV)	-0,7±3,3	-5,2±9,8	-1,6±2,2

Tableau 9 : Paramètres physico-chimiques des nanoparticules

La caractérisation a été réalisée sur les NPs +PVA standards, les NPs formulées avec 500 mg de PLGA et les NPs formulées avec du PLGA 75 :25 (acide lactique/acide glycolique). Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (taille, Pdl et potentiel zêta). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type (n=3).

5.3.2.2 Stabilité des NPs en milieu intestinal

L'augmentation de la quantité de PLGA dans la formulation des NPs n'a pas montré d'effet sur la libération d'insuline en milieu intestinal après 30 minutes d'incubation (68 ± 9 %) comparée aux NPs standards (72 ± 4 %) (Figure 69). Le même constat peut être fait pour les NPs formulées avec du PLGA 75:25 où la libération d'insuline est aussi importante (83 ± 4 %) que pour les NPs standards formulées avec du PLGA 50:50.

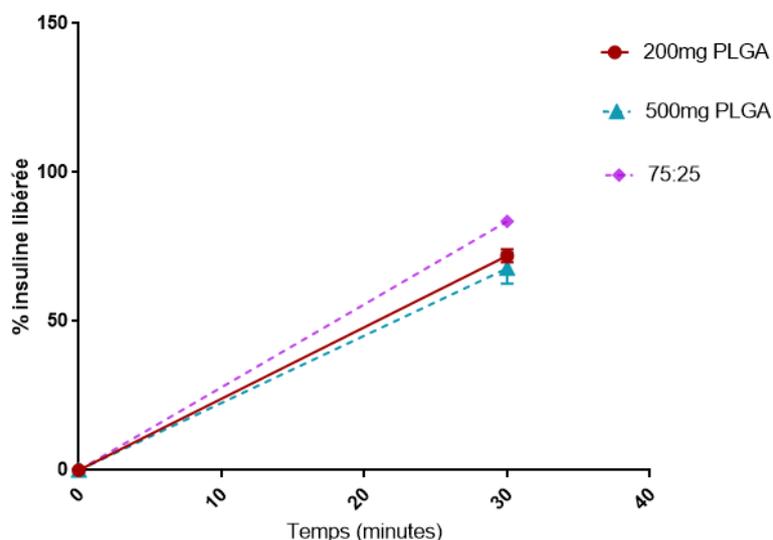


Figure 70 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal

Le pourcentage d'insuline libérée a été déterminé pour les NPs +PVA, les NPs formulées avec 500mg de PLGA et les NPs formulées avec du PLGA 75 :25 (acide lactique/acide glycolique) en milieu intestinal (pH=7.4) à 30 minutes. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37°C. La quantité d'insuline libérée a été déterminée par HPLC en utilisant la monographie de la pharmacopée Européenne. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n = 3).

5.3.3 Seconde stratégie : impact du tensio-actif

La seconde stratégie mise en place a consisté à tester d'autres tensio-actifs dans la 1^{ère} dispersion. En effet, celui-ci étant à la surface des gouttelettes d'émulsion, sa modification pourrait avoir un impact sur la libération d'insuline à pH=7.4.

Pour cela, un autre tensio-actif présentant une balance hydrophile-lipophile (HLB) plus faible a été utilisé, dont la structure est comparable au Pluronic[®] F68 mais ayant une lipophilie plus importante, le Pluronic[®] L81.

5.3.3.1 Caractérisation physico-chimique des NPs

La taille moyenne obtenue pour les NPs formulées avec du Pluronic[®] L81 est augmentée (292 ± 19 nm) comparée aux NPs standards. De plus, les NPs semblent s'agréger après quelques heures traduisant une instabilité du système. La charge de surface quant à elle reste neutre (Tableau 10).

	NPs Pluronic® F68	NPs Pluronic® L81
Taille (nm)	189±8	292±19
Pdl	0.19±0.06	0.18±0.02
Potentiel-ζ (mV)	2.7±5.3	-3.3±2.6

Tableau 10 : Paramètres physico-chimiques des NPs

La caractérisation a été effectuée pour les NPs +PVA, les NPs formulées du Pluronic® F68 (+PVA) et les NPs formulées avec du Pluronic® L81. Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (taille, Pdl et potentiel zêta). Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (n=3).

5.3.3.2 Stabilité des NPs en milieu intestinal

La formulation des NPs avec le Pluronic® L81 n'a pas montré de réduction de la quantité d'insuline libérée en milieu intestinal après 30 minutes d'incubation avec une quantité comparable à la quantité libérée pour les NPs formulées avec le Pluronic® F68 (100,7±2,4 %) (Figure 70).

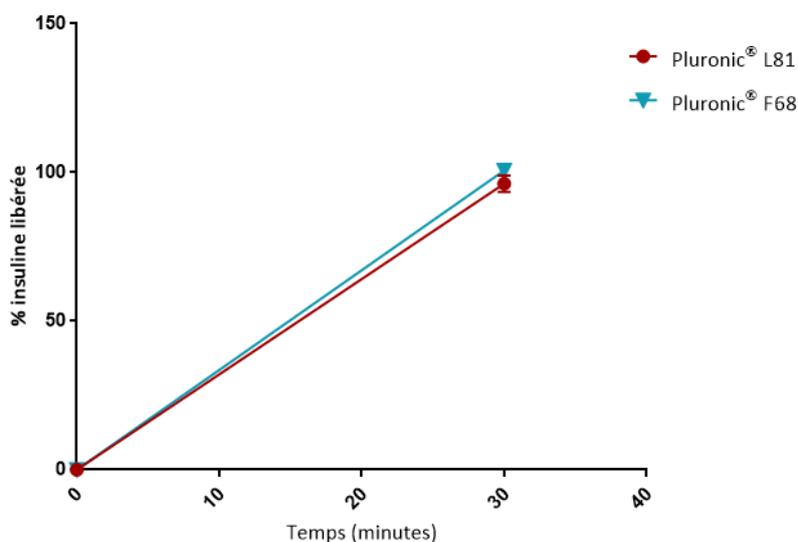


Figure 71 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal

Le pourcentage d'insuline libérée a été déterminé pour les NPs formulées avec du Pluronic® F68 (+PVA standards) et les NPs formulées avec du Pluronic® L81 en milieu intestinal (pH=7.4) à 30 minutes. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37°C. La quantité d'insuline libérée a été déterminée par HPLC en utilisant la monographie de la pharmacopée Européenne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 3).

5.3.4 Troisième stratégie : impact du recouvrement des NPs

Grâce à l'étude précédente concernant la charge des NPs, nous avons pu observer une réduction de la libération d'insuline grâce au recouvrement des NPs avec du chitosan. Le chitosan n'étant pas stable à pH proche de 7, le polyéthylène glycol (PEG) et l'acide hyaluronique (AH) ont donc été testés.

5.3.4.1 Caractérisation physico-chimique des NPs +PVA recouvertes

Le recouvrement des NPs standards montre dans le tableau 11, une augmentation de la taille des NPs que ce soit pour un recouvrement à l'acide hyaluronique ou au PEG 200 (272±37 et 225±4 nm) (Tableau 11). En revanche, avec l'acide hyaluronique, la taille des NPs semble moins homogène avec une augmentation du Pdl (0,53±0,01). Par contre, une légère charge négative apparaît à la surface des NPs (-6,5±2 mV) avec l'acide hyaluronique contrairement au recouvrement au PEG 200 qui montre une charge de surface nulle (-0,8±0,4 mV).

	NPs +PVA non recouvertes	NPs +PVA recouvertes d'acide hyaluronique	NPs +PVA recouvertes de PEG 200
Taille (nm)	189±8	272±37	225±4
Pdl	0,19±0,06	0,53±0,01	0,23±0,10
Potentiel-ζ (mV)	2,7±5,3	-6,5±2,0	-0,8±0,4

Tableau 11 : Paramètres physico-chimiques des NPs

La caractérisation a été réalisée sur les NPs standards non recouvertes (+PVA), les NPs recouvertes d'acide hyaluronique et les NPs recouvertes de PEG 200. Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (taille, Pdl et potentiel zêta). Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (n=3).

5.3.4.2 Stabilité des NPs en milieu intestinal

La figure 71 montre que l'incubation des NPs recouvertes d'acide hyaluronique et polyéthylène glycol nous montre une diminution significative de la quantité d'insuline libérée en milieu intestinal (41±4 et 38±3%) respectivement après 30 minutes d'incubation comparées aux NPs non recouvertes standards libérant 100% de l'insuline encapsulée.

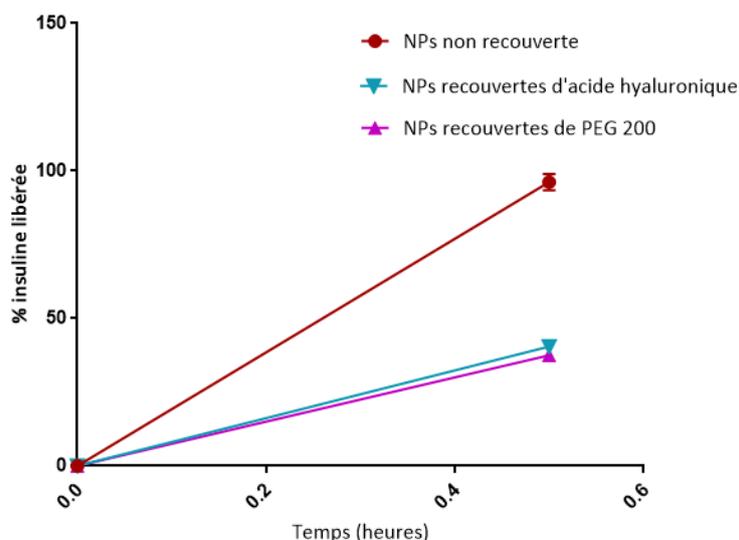


Figure 72 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal

Le pourcentage d'insuline libérée a été déterminé pour les NPs standards non recouvertes (+PVA), les NPs recouvertes d'acide hyaluronique et les NPs recouvertes de PEG 200 en milieu intestinal (pH=7.4) à 30 minutes. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37°C. La quantité d'insuline libérée était déterminée par HPLC en utilisant la monographie de la pharmacopée Européenne. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n \geq 3$).

L'impact du recouvrement des NPs avec le PEG 200 ou l'acide hyaluronique sur la libération d'insuline en milieu intestinal a donc été validé. La biocompatibilité ainsi que la charge négative de surface du recouvrement à l'acide hyaluronique en fait donc le candidat choisi pour une validation *in vitro*.

Dans ce contexte, les nanoparticules SDS ayant prouvé leur efficacité *in vitro* ont donc été choisies et testées avec le même recouvrement à l'acide hyaluronique.

5.3.4.3 Etude des NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique

5.3.4.3.1 Caractérisation physico-chimique des NPs

Le recouvrement des NPs SDS avec l'acide hyaluronique a montré une augmentation de la taille des NPs comparée aux NPs SDS non recouvertes ($189,9 \pm 11$ et $158,7 \pm 5$ nm). De plus, une forte augmentation du Pdl a été observée ($0,47 \pm 0,12$) traduisant une polydispersité des NPs. Pour la charge, les NPs recouvertes d'acide hyaluronique ont montré une charge négative de surface ($-6,4 \pm 2,2$ mV) mais plus faible pour les NPs SDS non recouvertes ($-11,3 \pm 3,5$) (Tableau 12).

	NPs SDS non recouverte	NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique
Taille (nm)	171±6	190±11
Pdl	0,14±0,07	0,47±0,12
Potentiel-ζ (mV)	-11,3±3,5	6,4±2,2

Tableau 12 : Paramètres physico-chimiques des différents types de nanoparticules

La caractérisation a été réalisée pour les NPs SDS et les NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique. Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (taille, Pdl et potentiel zêta). Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (n=3).

5.3.4.3.2 Stabilité des NPs en milieu intestinal

L'incubation des NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique nous montre une diminution significative de la quantité d'insuline libérée en milieu intestinal (31±2 %) respectivement comparée aux NPs SDS non recouvertes libérant environ 100% de l'insuline encapsulée après 30 minutes (Figure 72).

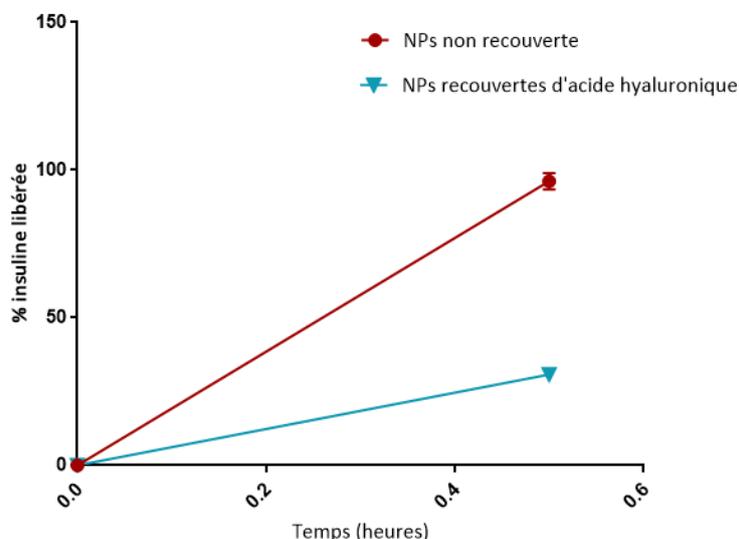


Figure 73 : Pourcentage d'insuline libérée des NPs en milieu simulé intestinal

Le pourcentage d'insuline libérée a été déterminé pour les NPs SDS et les NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique en milieu intestinal (pH=7.4) à 30 minutes. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37°C. La quantité d'insuline libérée a été déterminée par HPLC en utilisant la monographie de la pharmacopée Européenne. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n ≥ 3).

Cette meilleure stabilité des NPs recouvertes d'acide hyaluronique en milieu intestinal nous a donc amené à tester l'absorption intestinale de ces NPs *in vitro*.

5.3.4.3.3 Absorption intestinale *in vitro* des NPs

Une augmentation de la fluorescence associée aux cellules pour tous les types de NPs a été observée et comparée au contrôle négatif dans les deux modèles de culture cellulaire mais pas de façon identique. En effet, sur le modèle Caco-2, il semblerait qu'il y ait une forte augmentation de la fluorescence pour les NPs +PVA recouvertes d'acide hyaluronique comparées aux NPs +PVA non recouvertes et aux NPs SDS recouvertes ou non (Figure 73A). Pour le modèle co-culture en revanche, aucune augmentation de la fluorescence ne semble être observée pour les NPs +PVA recouvertes d'acide hyaluronique comparées aux +PVA non recouvertes (Figure 73B).

Pour les NPs SDS recouvertes ou non, sur les deux modèles, la fluorescence semblait plus importante que pour les NPs +PVA non recouvertes qui semblent être celles qui sont le moins internalisées dans tous les cas. Pour le recouvrement à l'acide hyaluronique sur les NPs SDS, seule une légère diminution de la fluorescence pourrait être observée sur les deux modèles comparées aux NPs SDS non recouvertes (Figure 73A et B). Ces essais sont évidemment à compléter.

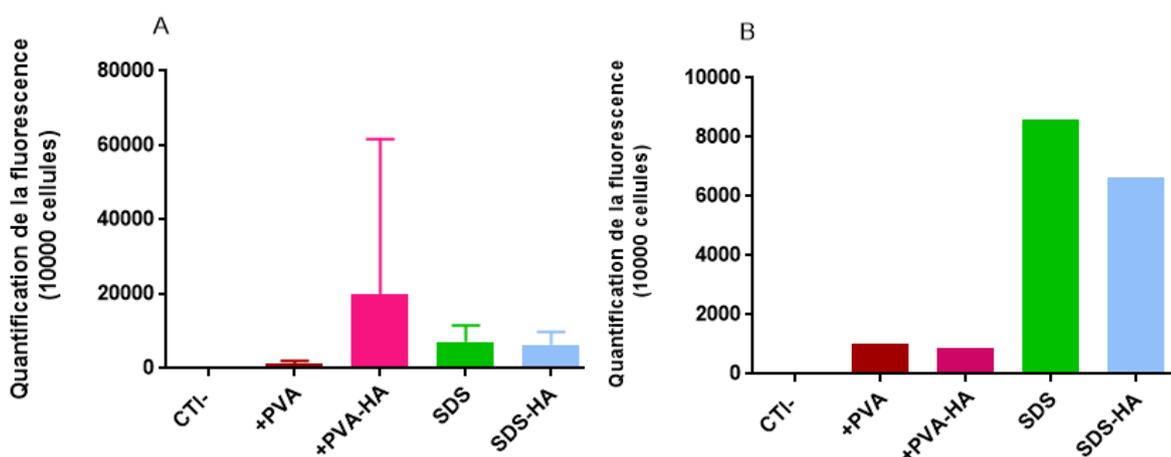


Figure 74 : Quantification de la fluorescence associée aux cellules

La quantification de la fluorescence a été mesurée après incubation 4 heures des NPs, les NPs SOP, les NPs SDS avec ou sans recouvrement à l'acide hyaluronique (HA) sur les deux modèles cellulaires, Caco-2 (A) et Caco-2/Rev HT29MTX (B) pendant 4 heures. La technique utilisée était la cytométrie en flux où 10000 événements ont été enregistrés par puits et les résultats ont été exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence \pm SEM ($n \geq 2$).

5.3.4.3.4 Validation *in vivo* des NPs

Les NPs SDS-HA c'est-à-dire recouvertes d'acide hyaluronique contenant de l'insuline rapide administrées par injection sous cutanée ou intrapéritonéale ont montré une diminution de la glycémie comparable à l'administration d'insuline rapide libre avec une normoglycémie atteinte une heure après administration (Figure 74A et B). Ces résultats sont corrélés avec l'insulinémie montrant après seulement 15 minutes une valeur identique, maximale et maintenue au bout d'une heure (Figure 75A et B). Pour les NPs SDS, en intrapéritonéal, les résultats obtenus sur la glycémie et l'insulinémie sont identiques aux autres groupes (Figures 74A et 75A). En revanche, en voie sous-cutanée, la baisse de la glycémie semble plus lente. Cette baisse de la glycémie semble se corrélérer avec l'insulinémie puisque les valeurs sont plus faibles que pour les autres groupes (Figures 74B et 75B).

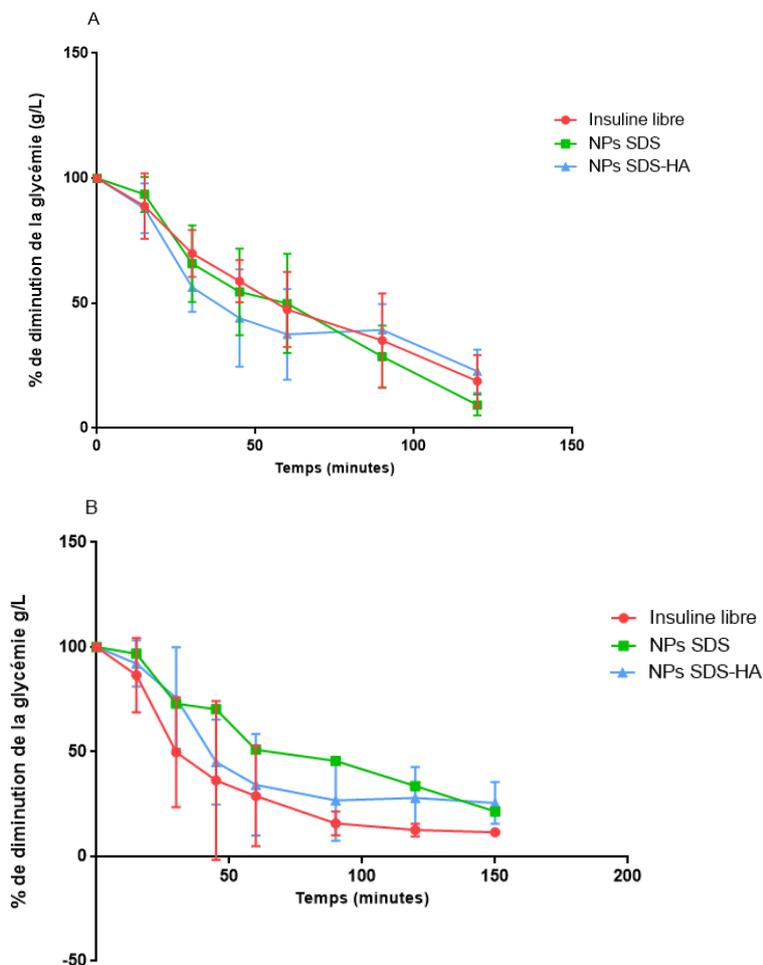


Figure 75 : Glycémie des rats diabétiques dans le temps

La glycémie a été mesurée après administration des NPs SDS et NPs SDS-HA encapsulant l'insuline rapide à une dose de 25 UI/kg par voie intrapéritonéale (A) ou sous-cutanée (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Une injection d'insuline libre a été utilisée en contrôle positif (n=3).

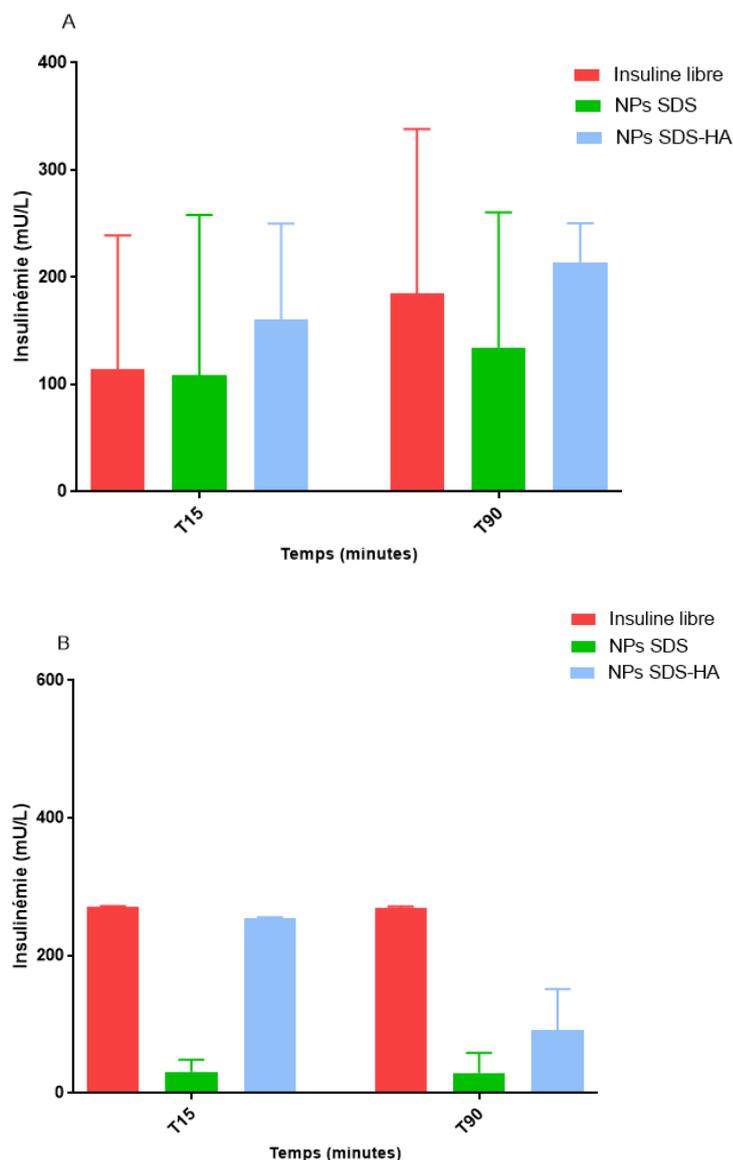


Figure 76 : Insulinémie des rats diabétiques dans le temps

L'évolution de l'insulinémie a été quantifiée après administration des NPs SDS et NPs SDS-HA d'insuline rapide à une dose de 25UI/kg par voie intrapéritonéale (A) ou sous-cutanée (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Une injection d'insuline libre a été utilisée en contrôle positif (n=3).

5.3.5 Discussion

De nombreux systèmes nanoparticulaires à base de PLGA permettent aujourd'hui l'encapsulation de principes actifs pour différentes administrations. La raison principale ? Le caractère biocompatible du PLGA approuvé par la FDA grâce à son hydrolyse dans le corps à un pH physiologique (Keles, 2015) comme énoncé précédemment. Mais ce qui nous semble être un atout peut également représenter un inconvénient pour une administration orale. En effet, un des rôles principaux des nanoparticules de PLGA est de protéger le principe actif du

milieu intestinal. Cependant, de nombreuses études ont montré une libération importante de celui-ci dans ce milieu contredisant cette protection et qui pourrait donc être associée entre autre à l'hydrolyse du polymère. En effet, le milieu intestinal étant à un pH proche de 7, pH aussi du milieu sanguin qui est la cible finale pour le délitement des nanoparticules (Chen *et al.*, 2018). Cette quantité de principe actif libérée est souvent décrite comme une libération rapide et importante parfois aussi appelée « burst release » (Chalasanani *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2015).

Pour expliquer cette hydrolyse du PLGA, il faut s'intéresser au caractère hydrophile du polymère. En effet, le PLGA a la particularité d'être très hydraté en présence d'eau favorisant son hydrolyse et sa fragmentation (Jiao *et al.*, 2001). Ce caractère hydrophile provient de sa composition en monomères, composés d'acide lactique et d'acide glycolique, ce dernier étant le plus hydrophile des deux (Sequeira J; Santos A, 2018) ;

Dans ce contexte, la stratégie mise en place a donc été de tester un PLGA contenant une quantité d'acide lactique plus importante afin de rendre le polymère moins hydrophile et ainsi absorber moins d'eau (Sadat *et al.*, 2014), se dégradant plus progressivement dans le but de réduire la libération de principe actif (Dinarvand *et al.*, 2011; Schliecker *et al.*, 2003) Malgré ces hypothèses, l'étude n'a pas montré de réduction de la libération de principe actif en milieu intestinal que ce soit en variant la quantité de polymère ou en changeant sa composition en monomères. Ces résultats semblent donc indiquer soit que la quantité d'acide lactique n'est pas assez importante pour apporter les propriétés lipophiles du PLGA soit que la théorie de l'hydrolyse du PLGA ne peut pas à elle seule expliquer cette libération.

Dans cette optique, nous nous sommes donc intéressés à d'autres mécanismes pouvant expliquer cette libération. Dans la littérature, plusieurs théories sont exposées : par exemple, de nombreux travaux associent cette libération au principe actif absorbé en surface des nanoparticules et non encapsulé au cœur des NPs. A cette surface, celui-ci peut alors subir une désorption à un pH proche de 7 (Soppimath *et al.*, 2001) entraînant sa libération. Dans ce cas-là, le terme « burst release » est réellement défini et est parfois référencé pour l'insuline (Patel *et al.*, 2012). Mais une étude antérieure réalisée en collaboration avec l'Institut Galien par calorimétrie différentielle à balayage a démontré que l'insuline n'était pas présente à la surface des nanoparticules, suggérant qu'elle est bien encapsulée au cœur des NPs (données non présentées).

Si on s'intéresse à la taille du principe actif, il a été démontré que l'encapsulation de principes actifs hydrophiles et de petite taille entraîne une libération par un mécanisme de diffusion du principe actif à travers la matrice polymérique. Dans le cas de l'insuline, protéine de taille moyenne (5000 Da) (Hinds *et al.*, 2005), cette théorie ne semble pas applicable.

En revanche, une autre explication semble plus réaliste pour les nanocapsules de PLGA : la libération de principe actif tel que l'insuline pourrait être associée à la porosité des NPs où l'insuline diffuserait à travers les pores. Il est vrai que de nombreuses études montrent une porosité en surface des NPs de PLGA et une corrélation entre la taille des pores et la libération du principe actif (Ding *et al.*, 2017).

En ce sens, Zang *et al.*, 2013 ont montré l'impact de la porosité des microparticules de PLGA encapsulant de la BSA formulée par la méthode de double émulsion évaporation de solvant sur la libération intestinale où, les microparticules poreuses ont montré une libération plus importante de BSA comparées aux microparticules non poreuses (Zhang *et al.*, 2013).

De plus cette étude pourrait confirmer que notre porosité est directement en lien avec notre technique de formulation où ils exposent qu'une étape d'évaporation de solvant entre les deux émulsions empêcherait la porosité des microparticules ce qui n'est pour l'instant pas le cas dans notre formulation.

Adressé à cette problématique, nous avons donc cherché à recouvrir les NPs à l'aide d'un polymère afin de combler les pores et ainsi empêcher la diffusion du principe actif. Afin d'appuyer cette idée, les résultats observés dans la première étude sur les charges de surface a montré une réduction de la libération intestinale des NPs chargées positivement grâce à un recouvrement au chitosan. La littérature conforte cette hypothèse puisque des études réalisées sur différents systèmes de nanoparticules recouvertes de chitosan ont montré une réduction de la libération de principes actifs à pH proche de 7 (Bayat *et al.*, 2008; Ramalingam *et al.*, 2016). Malgré des résultats intéressants, le chitosan a rapidement été abandonné de par son instabilité à pH proche de 7 qui se déprotone (Szymanska and Winnicka, 2015).

De ce fait, deux autres polymères ont alors été testés : le polyéthylène glycol (PEG) et l'acide hyaluronique. Le premier est très utilisé dans l'industrie pharmaceutique et le second a une biocompatibilité validée (Oh *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2017). En effet, l'acide hyaluronique est un élément de la matrice extracellulaire (Mansuri, 2016). De plus, ce dernier, contrairement au

PEG possède l'avantage d'être anionique à pH proche de 7 et donc de permettre l'apport d'une charge de surface négative permettant de potentialiser l'internalisation des NPs comme cela a été validé dans l'étude sur la charge de surface des NPs (Czuba *et al.*, 2018).

Cette charge négative a en effet été retrouvée à la surface des NPs nous confirmant ainsi la présence d'acide hyaluronique à la surface des NPs. Ce recouvrement a également eu un effet sur la taille des NPs qui a augmentée. Cette augmentation de taille peut être expliquée par la forte viscosité du polymère de recouvrement (Lamichhane *et al.*, 2015). De plus, la technique de recouvrement est uniquement basée sur une redispersion des NPs au sein d'une matrice type « gel » d'acide hyaluronique ne faisant donc entrer en jeu aucune interaction électrostatique entre l'acide hyaluronique et un des surfactants (Mansuri, 2016). Ce recouvrement semblerait être non homogène ce qui pourrait expliquer également l'augmentation de taille et de Pdl. Il conviendrait donc d'améliorer ce recouvrement en testant différentes concentrations de « matrice » d'acide hyaluronique en vue d'avoir une meilleure homogénéité en termes de taille.

Malgré un recouvrement instable, l'acide hyaluronique tout comme le PEG a montré des résultats intéressants réduisant fortement la libération du principe actif en milieu intestinal simulé.

Nous avons cependant cherché à déterminer si cette baisse de libération était uniquement due au recouvrement ou pourrait également être corrélée avec l'augmentation de taille des NPs associée. En effet, la littérature appuie fortement cette idée. Il a en effet été rapporté que la libération de principe actif serait moins conséquente pour des NPs de plus grande taille (Kumari *et al.*, 2010) et pourrait être expliquée par la réduction de surface de contact avec le milieu intestinal (Jogala *et al.*, 2015). Afin de vérifier cette hypothèse, des essais ont donc été réalisés avec des NPs de 400 nm mais n'ont montré aucune réduction de la libération (données non présentées).

Malgré des caractéristiques physico-chimiques intéressantes avec une taille identique aux NPs sans recouvrement et un effet conséquent sur la libération d'insuline en milieu intestinal, les contraintes de toxicité de l'utilisation du polyéthylène glycol nous ont conduit à poursuivre les essais biologiques uniquement avec l'acide hyaluronique ayant montré un effet comparable sur la libération intestinale que ce soit pour les NPs +PVA ou les NPs SDS. Ces résultats étant

corrélés avec la littérature où Han et al. ont montré une diminution de la libération de principe actif grâce à un recouvrement de NPs avec l'acide hyaluronique (Han *et al.*, 2012).

De ce fait, les NPs recouvertes d'acide hyaluronique ont donc été testées *in vitro* sur les deux modèles cellulaires de cellules intestinales (caco-2 et caco-2/HT29 MTX). Les résultats obtenus confirment ceux obtenus dans l'étude de la charge des NPs qui semblent donc être largement confirmés. En effet, les NPs chargées négativement semblent être mieux absorbées au niveau des cellules épithéliales que les NPs non chargées.

Pour les NPs recouvertes d'acide hyaluronique, celles-ci semblent montrer un passage intestinal prouvant que le recouvrement n'empêche pas l'absorption intestinale des NPs. De plus, il semblerait que les NPs +PVA recouvertes d'acide hyaluronique potentialisent ce passage.

En effet, en l'absence de cellules sécrétrices de mucus, une fluorescence associée aux cellules semblait plus forte pour les NPs recouvertes que celles non recouvertes. Ces données semblent plutôt contradictoires avec la littérature. En effet, il est connu que l'acide hyaluronique possède des propriétés muco-adhésives qui devraient donc potentialiser l'internalisation des NPs sur le modèle co-culture (Sandri *et al.*, 2004). En revanche, le poids moléculaire de celui-ci est sans doute trop important pour avoir un réel effet muco-adhésif (Mansuri, 2016). Une autre explication pourrait venir du fait que ce potentiel muco-adhésif de l'acide hyaluronique empêcherait le passage intestinal des NPs plutôt que de le potentialiser comme nous avons pu l'observer dans l'étude sur la charge de surface des NPs.

En revanche, sur le modèle caco-2, l'augmentation observée est corrélée avec la littérature où l'acide hyaluronique potentialise l'internalisation des NPs de PLGA (Lamichhane *et al.*, 2015). Une explication serait la présence du récepteur CD44, récepteur connu de l'acide hyaluronique (Lee *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017), à la fois présent dans les cellules épithéliales (Zeilstra *et al.*, 2013) et potentialisant l'internalisation des NPs (Han *et al.*, 2012). Une fois fixé, l'acide hyaluronique utiliserait un mécanisme d'endocytose pour s'internaliser (Choi *et al.*, 2010) au sein des cellules épithéliales.

Les NPs SDS semblent dans les deux cas être mieux internalisées *in vitro* sur les deux modèles cellulaires nous amenant vers une validation *ex-vivo* des NPs SDS recouvertes d'acide hyaluronique.

Ainsi, nous avons testé la libération de principe actif des NPs dans le sang, après administration par voies injectables en sous-cutanée et en intrapéritonéale et avons montré une normo-glycémie corrélée avec l'insulinémie après seulement une heure confirmant que d'une part l'encapsulation n'a aucun effet retard sur l'insuline administrée mais également que le recouvrement n'a aucun effet sur la libération de l'insuline dans le sang. Pour confirmer cela, une étude a montré une libération plus importante de principe actif dans le sang qu'en milieu intestinal après incubation de NPs de PLGA (Zhang, 2013). Cela pourrait être dû à la différence de pH entre le sang (7,4) et le milieu intestinal (6,8) où le PLGA se comporte différemment (Sun *et al.*, 2015).

Pour conclure, nous avons montré qu'un recouvrement des nanoparticules avec une matrice d'acide hyaluronique permettait à la fois de réduire la libération d'insuline en milieu intestinal mais également n'empêchait ni le passage des NPs à travers l'épithélium, ni le relargage du principe actif dans le sang. En revanche, ce recouvrement reste à optimiser d'un point de vue homogénéité en vue d'une future administration orale *in vivo* chez le rat diabétique.

5.4 Transposition du système nanoparticulaire à l'héparine

5.4.1 Contexte de l'étude

L'héparine, anticoagulant fréquemment utilisé dans le cas du traitement des thromboses veineuses profondes (TVP) et de certaines coagulopathies est largement préconisée dans différents contextes cliniques et associée à un minimum d'effets secondaires ainsi que peu d'interactions médicamenteuses. Mais son utilisation est limitée en raison de son mode d'administration parentéral contraignant à la fois pour le patient ainsi que pour le personnel hospitalier. Afin de réduire ces contraintes, la voie orale semble s'imposer comme alternative. Ainsi nous avons transposé notre système de double encapsulation à l'héparine.

L'étude précédente a permis de valider l'efficacité du système encapsulant l'insuline chez le rat diabétique. De ce fait, cette technologie peut être transposée à un autre bio-médicament de nature non protéique telle que l'héparine.

Dans le but de réaliser cette étude, trois types d'héparine ont été choisis dont deux héparines de bas poids moléculaires que sont l'énoxaparine (Lovenox[®]) d'origine naturelle et le fondaparinux (Arixtra[®]) d'origine synthétique ainsi qu'une héparine non fractionnée (Choay[®]). Ces trois molécules ont été encapsulées dans deux types de nanoparticules différents que sont les nanoparticules formulées avec du PVA (+PVA) qui sont nos NPs standards, notre référence, et les nanoparticules formulées avec du SDS (SDS), chargées négativement et qui encapsulent l'insuline ont montré l'efficacité *in vivo*.

5.4.2 Caractérisation physico-chimique des NPs

Après avoir formulé les différentes nanoparticules, celles-ci ont été caractérisées en termes de taille, Pdl et charge de surface (potentiel zêta). L'efficacité d'encapsulation a également été mesurée. Ces différents paramètres sont retranscrits dans le tableau 13. En termes de taille, toutes les formulations ont montré une taille inférieure à 200 nm pour les deux types de NPs (+PVA et SDS) encapsulant les trois types d'héparine. Plus particulièrement, on a observé une taille moyenne plus faible pour les NPs SDS (164 ± 11 , 168 ± 8 et 170 ± 6 nm) comparée aux NPs formulées avec du PVA (+PVA) (195 ± 9 , 196 ± 9 et 164 ± 5 nm). En revanche, la répartition en taille est homogène pour tous les types de nanoparticules avec des valeurs de $PdI \leq 0,2$. Pour la charge de surface, à notre surprise, les nanoparticules SDS ont montré une charge de

surface négative plus faible pour le fondaparinux ($-5\pm 8\text{mV}$) que pour l'énoxaparine et l'héparine Choay® (-21 ± 10 et -14 ± 8 mV). En revanche, comme attendu, pour les NPs formulées avec du PVA, la charge de surface était nulle pour les trois types d'héparine encapsulés. En termes d'efficacité d'encapsulation, toutes les formulations de NPs ont présenté une valeur au-dessus de 80 % avec de faibles écarts-types d'une mesure à l'autre.

Type de NPs		Taille (nm)	PdI	Charge (mV)	Efficacité d'encapsulation
Enoxaparine	PVA	195±9	0,13±0,05	-2±5	90±0
	SDS	164±11	0,18±0,05	-21±10	89±1
Fondaparinux	PVA	196±9	0,10±0,05	-1±2	92±0
	SDS	168±8	0,12±0,06	-5 ±8	81±3
Héparine non fractionnée	PVA	164±5	0,14±0,09	1±2	88±1
	SDS	170±6	0,20±0,06	-14±8	93±2

Tableau 13 : Paramètres physico-chimiques des différents types de nanoparticules

La caractérisation a été réalisée sur les NPs standards, non recouvertes (+PVA) et les NPs SDS encapsulant l'énoxaparine, le fondaparinux et l'héparine non fractionnée. Les mesures ont été effectuées par la technique de diffusion dynamique de la lumière (taille, PdI et potentiel zêta) et l'efficacité d'encapsulation a également été déterminée. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (n=3).

5.4.3 Stabilité des NPs dans le temps

La stabilité des différents paramètres physico-chimiques ainsi que l'efficacité d'encapsulation des différentes formulations de NPs encapsulant l'énoxaparine et le fondaparinux ont été étudiés pendant 21 jours après une conservation à 4 °C (Figure 76).

Les résultats ont montré une taille stable après 21 jours pour toutes les formulations ainsi qu'une légère diminution de la charge de surface négative pour les NPs encapsulant l'énoxaparine à 21 jours.

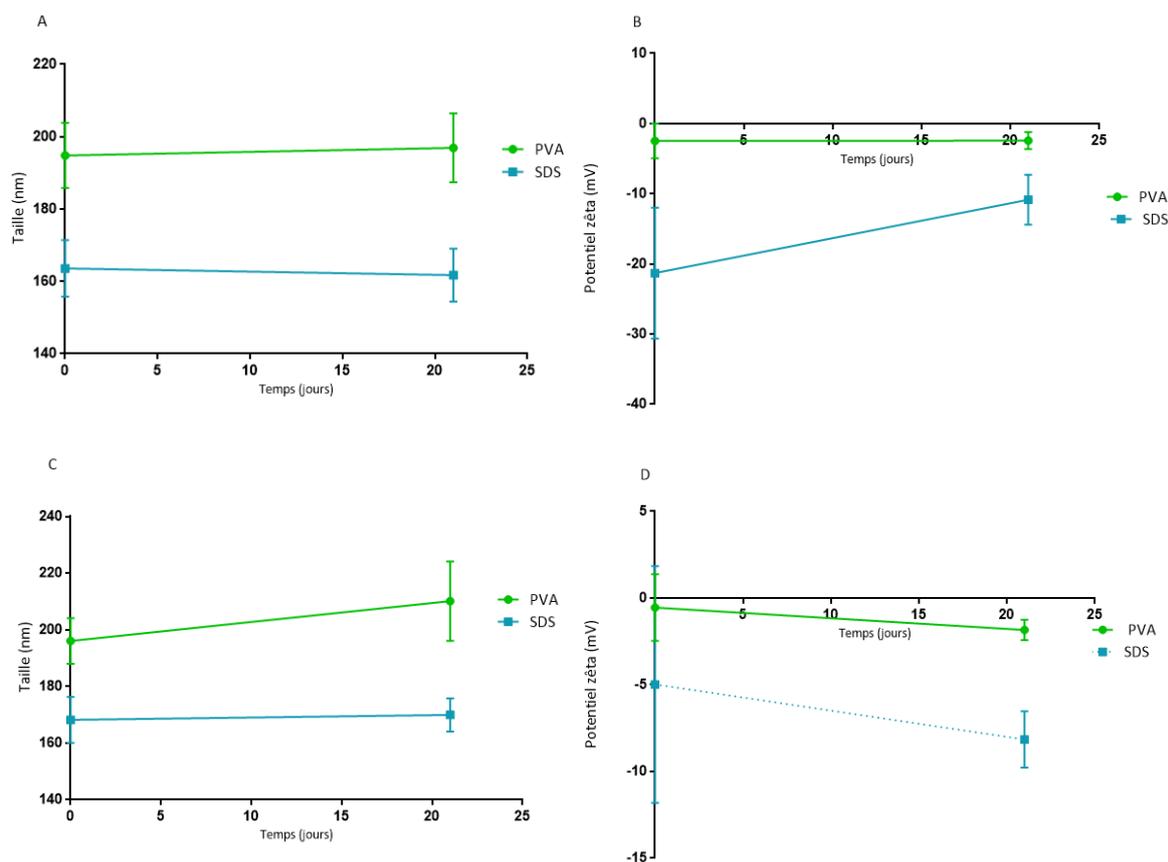


Figure 77 : Stabilité des paramètres physico-chimiques des NPs d'héparine dans le temps

La stabilité a été mesurée sur les NPs +PVA et NPs SDS encapsulant l'énoxaparine et le fondaparinux en termes de taille pour enoxaparine (A) et fondaparinux (C) et de potentiel zêta pour enoxaparine (B) et fondaparinux (D) et ont été évalués à T0 et à T21 jours. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type (n=3).

5.4.4 Stabilité des NPs en milieux simulés

La stabilité des NPs encapsulant l'énoxaparine a été testée en milieux gastrique et intestinal simulés et a montré une libération d'héparine d'environ 30 % pour les deux milieux (Figure 77A).

En ce qui concerne les NPs encapsulant le fondaparinux, celles-ci n'ont pas pu à l'heure actuelle être testées due à une réaction entre les NPs et les milieux simulés nous empêchant de réaliser une gamme d'étalonnage en milieux simulés (Figure 77B).

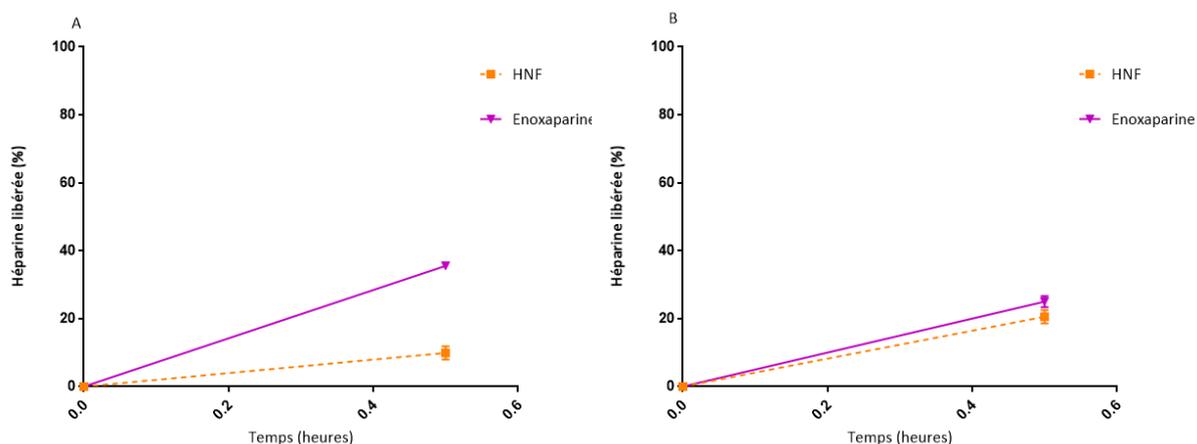


Figure 78 : Pourcentage d'héparine libérée des NPs en milieux simulés

Ce pourcentage a été mesuré pour les NPs +PVA encapsulant l'énoxaparine (A) et l'héparine non fractionnée (B) en milieu gastrique (pH=1,2) et intestinal (pH=7,4) simulés à 30 minutes. Toutes les expérimentations ont été réalisées à 37 °C. La quantité d'héparine libérée était déterminée par spectrophotométrie visible. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 3$).

5.4.4.1 Toxicité *in vitro* des NPs

La toxicité des différentes formulations de NPs d'héparine a été testée en déterminant la viabilité des deux modèles cellulaires : caco-2 et caco-2/Rev HT29MTX. Ces viabilités ont été comparées à la viabilité des cellules n'ayant pas reçu de traitement, utilisées comme contrôle négatif (100 %) (Figure 78). Sur le modèle caco-2, aucune diminution de la viabilité cellulaire n'a été observée après incubation des NPs +PVA et SDS que ce soit pour le fondaparinux ou l'énoxaparine excepté une légère diminution pour les NPs SDS encapsulant l'énoxaparine à 76 ± 6 % comparée au contrôle négatif (100 %) ($p < 0,05$). En revanche, sur le modèle co-culture, on observe une diminution significative de la viabilité pour les NPs SDS enoxaparine et fondaparinux avec 74 ± 9 ($p < 0,01$) et 82 ± 9 % ($p < 0,05$) comparée au contrôle négatif (100 %). La même observation a été réalisée pour les NPs +PVA fondaparinux avec une viabilité de 78 ± 10 % comparée aux cellules sans traitement (100 %) ($p < 0,01$).

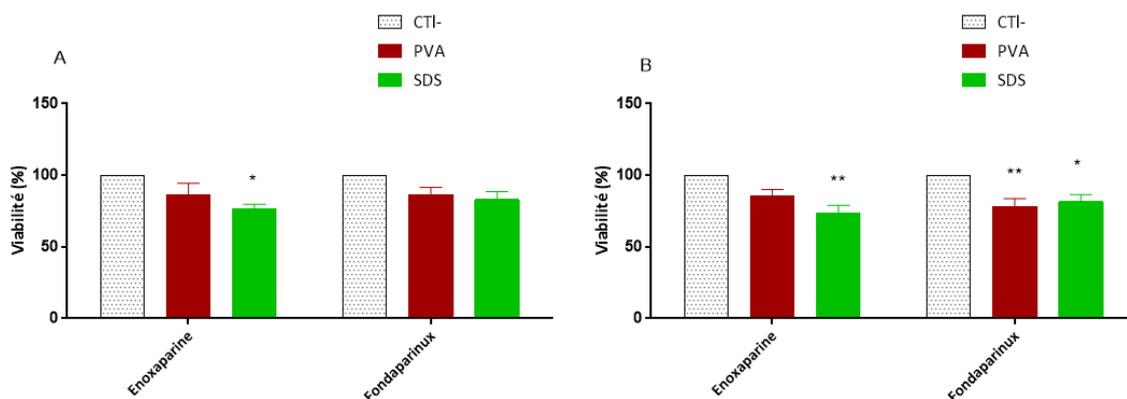


Figure 79 : Pourcentage de viabilité cellulaire

La viabilité a été mesurée par la technique MTS après incubation des NPs +PVA et NPs SDS encapsulant l'énoxaparine et le fondaparinux sur les deux modèles cellulaires Caco-2 (A) et co-culture Caco-2/RevHT29 MTX (B). Les cellules sans incubation étaient utilisées comme contrôle positif et défini à 100 % de viabilité. Les résultats ont été exprimés en moyenne±SEM. Toutes les données ont été comparées au contrôle négatif. La significativité était fixée à ** $p < 0,01$ vs. contrôle négatif, * $p < 0,05$ vs. contrôle négatif ($n \geq 3$).

5.4.4.2 Effet *in vitro* des NPs sur les jonctions serrées

L'impact des nanoparticules d'héparine sur les jonctions serrées de l'épithélium intestinal a été testé *in vitro* sur les deux modèles cellulaires caco-2 et caco-2/Rev HT29MTX. Pour cela, la résistance trans-épithéliale (TEER) a été mesurée, le but étant de voir l'impact des NPs sur la TEER (Figure 79). Pour le contrôle positif, l'EGTA, on observe une diminution significative de la TEER dès une heure d'incubation ($P < 0,005$). En revanche, pour le contrôle négatif correspondant aux cellules sans traitement aucune diminution significative n'a été observée durant les 5 heures d'incubation. Pour les conditions NPs, le modèle co-culture n'a pas montré de diminution significative de la TEER pour les NPs +PVA et SDS encapsulant l'énoxaparine et le fondaparinux comparée au contrôle négatif (Figure 79B). En revanche, sur le modèle caco-2, les NPs formulées avec du SDS ont montré une diminution significative de la TEER pour le fondaparinux et l'énoxaparine (60 ± 14) et (56 ± 9 %) respectivement ($P < 0,05$) comparée aux cellules sans incubation (Figure 79A). Sur le même modèle, les NPs +PVA, quant à elles, n'ont pas montré de diminution de la TEER comparée au contrôle négatif.

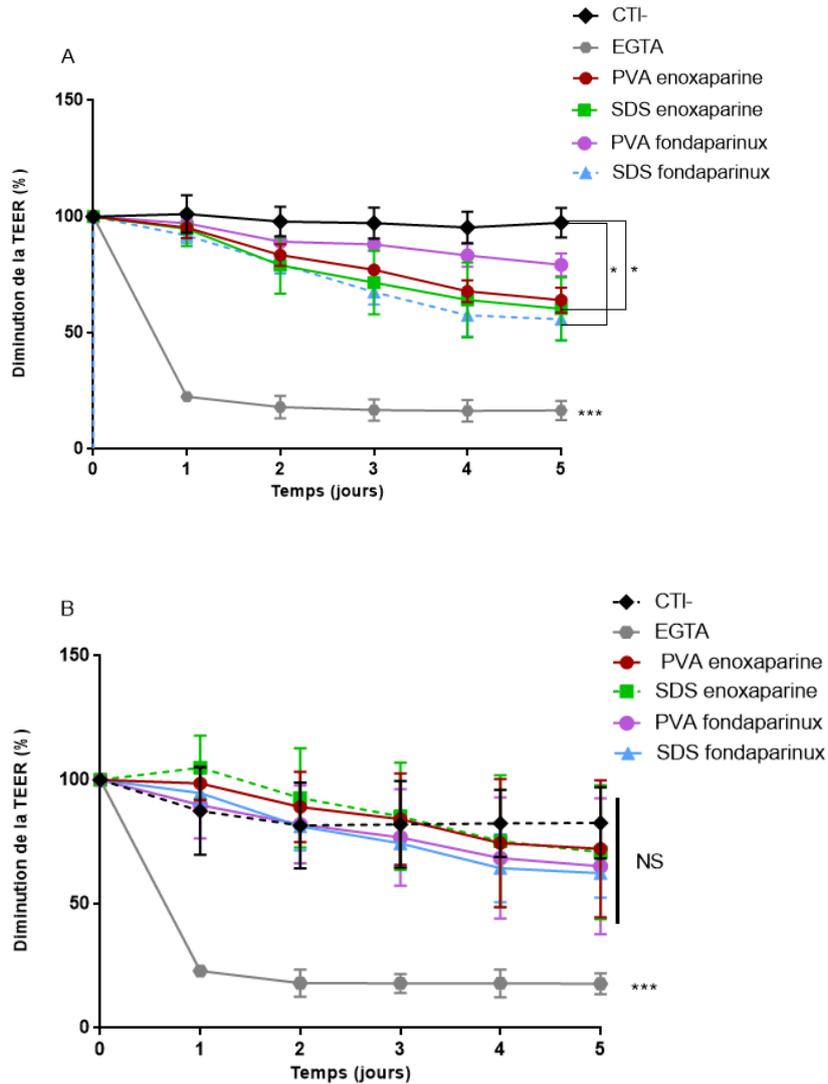


Figure 80 : Pourcentage de diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) cellulaire

La TEER a été mesurée après incubation des NPs +PVA et NPs SDS encapsulant l'énoxaparine et le fondaparinux sur les deux modèles cellulaires, Caco-2 (A) et caco-2/Rev HT29MTX (B) pendant 5 heures. L'EGTA a été utilisé comme contrôle positif d'ouverture des jonctions serrées. Les résultats sont exprimés par rapport à la valeur initiale en moyenne \pm SEM. Toutes les données ont été comparées au contrôle négatif. La significativité était fixée à * $p < 0,05$ vs. contrôle négatif ($n \geq 3$) et *** $p < 0,005$ vs. contrôle négatif ($n \geq 3$).

5.4.4.3 Absorption intestinale des NPs in vitro

L'internalisation des NPs a été déterminée par cytométrie en flux par encapsulation d'héparine non fractionnée fluorescente sur les deux modèles : caco-2 (Figure 80A) et caco-2/Rev HT29MTX (Figure 80B). Les résultats présentés ont montré une augmentation de la fluorescence associée aux cellules après incubation des NPs d'héparine fluorescente (HNF-FITC) formulées avec du PVA (+PVA) et du SDS (SDS) sur les deux modèles cellulaires et comparée aux cellules sans incubation.

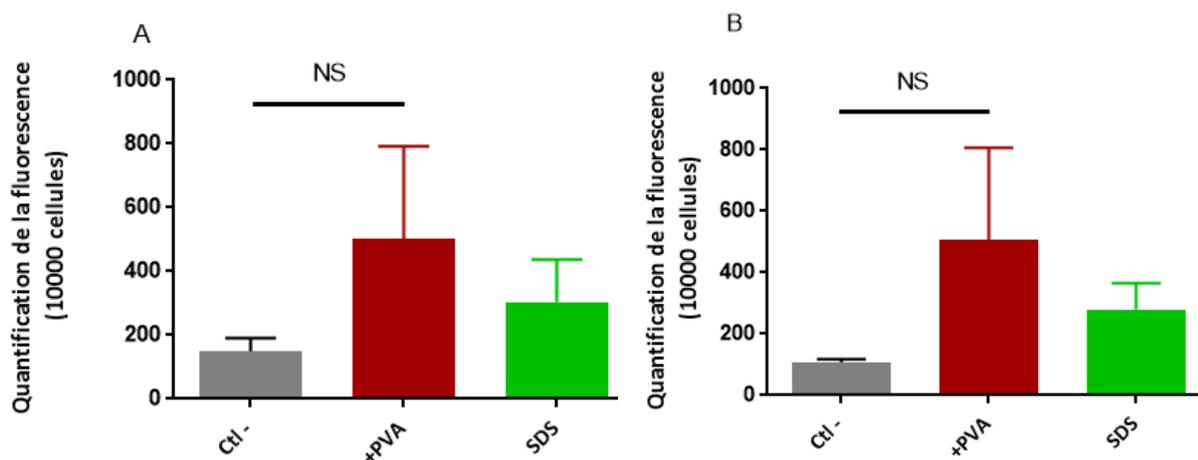


Figure 81 : Quantification de la fluorescence associée aux cellules

La quantification a été réalisée après incubation des NPs +PVA et SDS sur les deux modèles cellulaires, Caco-2 (A) et Caco-2/Rev HT29MTX (B) pendant 4 heures. La technique utilisée était la cytométrie en flux où 10000 événements ont été enregistrés par puit. Les résultats ont été exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence \pm SEM. Toutes les données ont été comparées au contrôle négatif et aux NPs +PVA ($n=3$).

5.4.4.4 Etude ex-vivo : relargage d'héparine dans le sang

Cette étude permet de déterminer la cinétique de libération de l'héparine par les NPs après incubation de celles-ci dans le sang des rats. Pour cela, une quantification d'héparine dans le plasma a été réalisée et les résultats sont présentés dans la figure 81. Ainsi, on a pu observer une concentration d'héparine dans le sang comparable pour les conditions incubées avec des NPs et pour les conditions héparine libre dès 15 minutes prouvant une libération rapide de la totalité de l'héparine encapsulée des NPs que ce soit pour les NPs +PVA ou SDS. Cette libération reste ensuite constante jusqu'à deux heures. Comme attendu, aucune héparine n'a été dosée pour la condition NPs vides. (Figure 81).

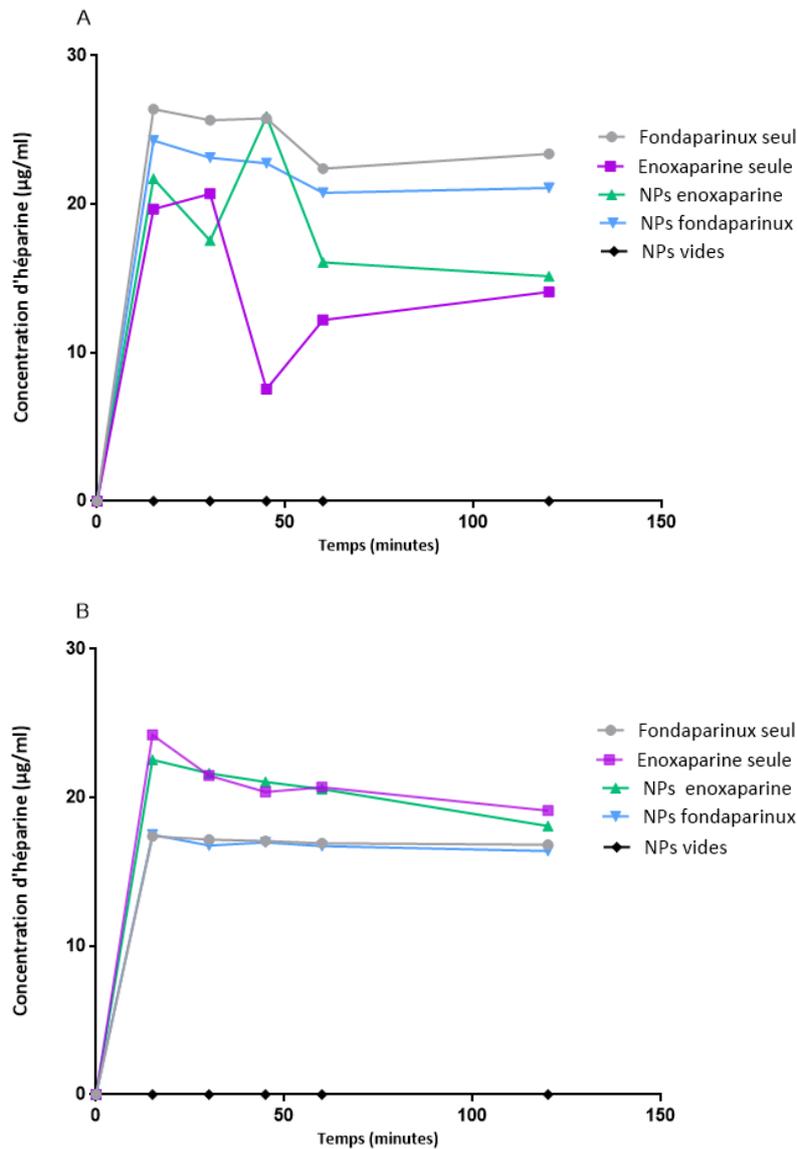


Figure 82 : Concentration d'héparine dans le sang des rats

La concentration d'héparine libérée a été déterminée pour les NPs +PVA(A) et SDS (B) encapsulant l'énoxaparine et le fondaparinux, après incubation pendant 2 heures. De l'énoxaparine et du fondaparinux non encapsulés ont été utilisés comme contrôle positif et les nanoparticules sans héparine comme contrôle négatif (n=1).

5.4.5 Discussion

Le but de ce travail était de transposer notre technologie à base de NPs de PLGA à un autre principe actif. A ce jour, notre système a principalement été validé sur l'encapsulation de principes actifs d'origine protéique tels que l'insuline ou encore le peptide P140. En revanche, la capacité d'encapsuler des principes actifs non protéiques via notre technologie n'a à ce jour pas été adressée.

Pour cela, le choix du principe actif est primordial. En effet, la technique de formulation utilisée c'est à dire la double émulsion et évaporation de solvant n'est capable d'être

appliquée en l'état uniquement à des principes actifs hydrophiles puisqu'elle consiste en une première dispersion eau dans huile dont la phase aqueuse doit contenir ce principe actif. C'est pourquoi l'héparine, molécule hydrophile entrainée parfaitement dans ce critère de sélection. De plus, ce bio-médicament administré dans le traitement des MTVE, peut avoir un réel intérêt pour la voie orale. Pour comprendre la pertinence de l'approche, il est indispensable de différencier les types d'héparines disponibles aujourd'hui administrées par voie parentérale, à savoir l'héparine non fractionnée d'une part et les héparines de bas poids moléculaire d'autre part.

L'héparine non fractionnée, utilisée comme traitement de base contre les maladies thromboemboliques veineuses est à ce stade privilégiée dans des situations dites « d'urgence » en milieu hospitalier à cause de sa faible demi-vie et ses effets indésirables (Flevas *et al.*, 2018) où une transposition à la voie orale de par son délai d'action n'est que peu adaptée.

C'est pourquoi, elle est aujourd'hui de plus en plus remplacée par les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) utilisées en traitement préventif et chronique grâce à leur meilleure biodisponibilité et leurs faibles effets indésirables entraînant la diminution du nombre d'injections (Ibrahim, 2016). L'intérêt pour la voie orale est donc cette fois-ci bien réel.

Au-delà de l'effet biologique, ces différentes héparines se différencient également par leur poids moléculaire.

En effet, l'HNF avec un poids moléculaire moyen de 14000 Da et les deux HBPM sélectionnées, l'énoxaparine avec un poids moléculaire moyen de 8000 Da et le fondaparinux à 1600 Da. Ce dernier, d'origine synthétique offre donc une formulation reproductible présentant un avantage en termes de reproductibilité (Gray *et al.*, 2008) contrairement aux autres héparines dont la structure est très hétérogène. L'objectif en étudiant ces différentes héparines est donc d'évaluer l'impact du poids moléculaire sur notre système d'encapsulation.

Une fois les principes actifs sélectionnés, la transposition a été réalisée en plusieurs étapes à la fois sur les NPs standards utilisées en contrôle mais surtout sur les NPs SDS ayant montré leur efficacité *in vivo* avec l'insuline. Il a donc tout d'abord été nécessaire de caractériser les NPs formulées d'un point de vue physico-chimique afin de tester l'effet de la nature du principe actif sur la formulation des nanoparticules (taille, charge de surface, efficacité

d'encapsulation...). La toxicité de ces systèmes nanoparticulaires ainsi que leur absorption ont ensuite été évaluées sur les lignées d'épithélium intestinal. Les nanoparticules ont finalement été validées *ex-vivo* afin de tester leur capacité à libérer dans le sang l'héparine dans le but d'une future administration orale *in vivo*.

Les trois héparines sélectionnées ont ainsi été encapsulées dans des NPs d'un diamètre d'environ 200 nm. Contrairement à la taille obtenue, identique à celle obtenue avec l'insuline, et ne variant pas d'un type d'héparine à l'autre, la charge de surface des NPs semble varier avec une charge qui reste tout de même stable pendant 21 jours. L'efficacité d'encapsulation quant à elle de manière surprenante n'a pas été impactée par le poids moléculaire des différentes héparines avec des valeurs supérieures à 80 %, reproductible d'une formulation à l'autre.

Les différences observées au niveau de la charge des NPs (comparées aux charges obtenues avec l'insuline) entre autre une diminution de la charge négative des NPs SDS, pourraient être expliquées par l'héparine encapsulée en partie en surface des NPs contrairement à l'insuline encapsulée au cœur des NPs (Cf 5.3.5) malgré la transposition du protocole de formulation à l'identique. L'héparine apporterait ainsi sa propre charge négative masquant ainsi la charge fortement négative du SDS (Shahbazi *et al.*, 2013), utilisé en faible concentration (0,01 %) contrairement au PVA (2,5 % m/v).

De plus, elle expliquerait la différence de charge observée entre les différentes héparines. En effet, chaque héparine selon son poids moléculaire ne possède pas le même nombre de groupements sulfates faisant varier la charge négative d'une héparine à l'autre (Hoffart *et al.*, 2002; Oyarzun-Ampuero *et al.*, 2009; Shahbazi *et al.*, 2013).

Cette hypothèse semble corrélée avec la littérature qui comporte plusieurs études parlant d'héparine en surface au sein de micro ou nanocapsules et montrant une charge de surface fortement négative qui pourrait lui être attribuée (Hoffart *et al.*, 2006; Lamprecht, 2006).

De plus, il est largement connu qu'il existe deux types d'encapsulation de principe actif au sein de nanocapsules : soit le principe actif est contenu au cœur des NPs soit il se trouve en surface (Ranjit, 2013; Sandeep Kumar, 2012). L'héparine serait donc bien encapsulée au sein du système mais en surface.

Mais une question se pose : pourquoi l'héparine serait-elle en surface ? Pour l'expliquer, la littérature parle de principes actifs de nature hydrophile qui auraient une tendance à diffuser vers la phase aqueuse en utilisant la technique de double émulsion évaporation de solvant (Jameela *et al.*, 1997). Celle-ci pourrait alors se produire avant même l'étape d'évaporation et la formation de la « coque » polymérique de PLGA.

Il semblerait donc judicieux de réaliser une étude de la composition chimique de la surface des NPs comme faite pour l'insuline afin de confirmer cette hypothèse émise pour l'héparine. Malgré cela, il reste difficile de comparer la charge apportée par un tensio-actif tel que le SDS à celle apportée par les différentes héparines. Par exemple, une étude a montré que l'héparine (HNF) augmentait significativement la charge négative des NPs de PLGA à -40 mV mais de façon concentration dépendante (Chung *et al.*, 2006) quand elle est située à la surface. L'héparine pourrait donc n'y être qu'en partie ou en faible concentration faisant donc apparaître une charge de surface négative faible en surface. Cette hypothèse a été confirmée par des études préliminaires réalisées à l'aide d'héparine plus concentrée où la charge négative de surface augmentait fortement (données non présentées).

D'un point de vue stabilité, la transposition du système nanoparticulaire semble avoir impacté les propriétés des NPs en termes de stabilité gastrique et intestinale. En effet, il est connu que l'héparine est stable à pH acide (Chung *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 1980; Lamichhane *et al.*, 2015). Une étude a même montré l'utilisation d'héparine comme recouvrement de NPs prétraitée en milieu acide (Moazed *et al.*, 2007). En revanche, en milieu intestinal, il est connu que le système de NPs de PLGA libère le principe actif à un pH proche de 7. Le mécanisme de libération à privilégier serait donc la désorption de l'héparine se situant à la surface des NPs et diffusant vers la phase aqueuse (Shahbazi *et al.*, 2013) correspondant donc à un réel « burst release » de l'héparine.

D'un point de vue biologique, la charge négative de surface semblait a priori être un atout pour l'absorption des NPs au niveau intestinal. De ce fait, le passage a été évalué sur les deux modèles cellulaires intestinaux (caco-2 et caco-2/REV HT29) par cytométrie en flux. Mais de façon surprenante, un signal fluorescent nettement plus faible que celui obtenu pour les NPs d'insuline a été observé. Une trop faible concentration en héparine FITC utilisée pourrait en être la cause. Il conviendrait donc de tester une concentration plus forte. En revanche, dans

le cas où le signal n'augmenterait pas, ce faible signal pourrait donc être attribué à l'héparine en surface qui a déjà montré une réduction de l'internalisation en recouvrement de NPs (Lamichhane *et al.*, 2015).

D'un point de vue mécanistique, malgré un signal faible, les NPs chargées négativement semblent être absorbées au niveau intestinal par un mécanisme d'ouverture des jonctions serrées au vu de la diminution de la TEER (Taverner *et al.*, 2015). Cette diminution pourrait être due à des interactions avec les ions Ca^{2+} des jonctions entraînant l'ouverture de celles-ci (Sajeesh *et al.*, 2010). Ce mécanisme est d'ailleurs utilisé par les chélateurs de calcium comme l'EGTA créant un cycle avec les ions Ca^{2+} réduisant ainsi la concentration de calcium extracellulaire (Boulenc *et al.*, 1993) et utilisé comme contrôle positif dans notre étude.

Cette ouverture pose donc la question d'une potentielle toxicité à long terme se corrélant avec la légère diminution de viabilité restant tout de même au-dessus de 70% qui pourrait être expliquée par des décollements cellulaires. Ces décollements réduisent ainsi le nombre de cellules totales et donc vivantes au vu de la méthode de quantification utilisée mesurant l'activité mitochondriale. Des contrôles de nanoparticules vides ont été réalisés avec l'insuline et n'ont jamais montré de diminution de viabilité à la concentration testée (5mg PLGA/puit). Cette toxicité est donc forcément attribuée à l'héparine (en surface ou non) et non aux NPs en tant que telles. Afin de répondre à cette problématique, des contrôles avec de l'héparine seule devront être réalisés. Un test de viabilité complémentaire devra être réalisé comme avec un marquage fluorescent au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) par exemple.

Grâce à une méthode précise de quantification de l'héparine dans le sang basée sur l'activité du facteur de coagulation Xa, une étude *ex vivo* permettant de démontrer le relargage d'héparine des NPs, but ultime de l'étude a pu être réalisée. Cette technique n'est pour l'instant pas applicable à l'insuline car aucune technique de quantification de l'insuline dans le sang n'est aujourd'hui réellement fiable en raison de la faible concentration en insuline à doser et la composition du fluide sanguin.

Ainsi, les deux héparines de bas poids moléculaire ont montré une libération rapide dès 15 minutes du principe actif par les NPs de PLGA dans le sang, cible finale du système d'encapsulation. Cette libération est directement attribuée aux propriétés d'hydrolyse du PLGA où il peut également se fragmenter entraînant ainsi la libération du principe actif (Jiao *et al.*, 2002).

Malgré des essais à réitérer, les quantités retrouvées prouvent donc que les NPs de PLGA encapsulant de l'héparine possède un profil de libération identique à de l'héparine libre et donc que l'encapsulation de l'héparine dans ces systèmes ne retarde pas la l'action de celle-ci par voie parentérale. De plus, l'héparine semble biologiquement active dans le sang avec un effet sur l'activité du facteur Xa confirmant que l'héparine n'a pas été atteinte par le procédé de formulation des NPs.

Pour conclure cette étude, la transposition des NPs de PLGA à l'héparine semble être validée d'un point de vue physico-chimique au sein de notre système de nanocapsules malgré l'hypothèse d'une localisation en surface. *In vitro*, les NPs ont montré une baisse de viabilité qui reste acceptable avec des valeurs au-dessus de 70 % pour toutes les conditions. En revanche, pour le confirmer il serait intéressant de définir plus en détail le mécanisme de passage intestinal de ces NPs grâce par exemple à des inhibiteurs des voies d'endocytose ou même l'utilisation de molécules à fort poids moléculaire afin de tester le passage paracellulaire.

En revanche, les NPs ont montré un relargage de la totalité de l'héparine encapsulée du système dans le sang nous permettant de nous projeter vers la prochaine étape qui est la validation *in vivo* de ces NPs d'héparine.

Dans un premier temps, par une administration par voie sous-cutanée et intra-péritonéale puis dans un second temps par voie orale sur un modèle de rat sain. Un modèle pathologique pourra en parallèle être développé pour tester *in fine* le système.

Conclusions de la thèse

6 Conclusion scientifique et perspectives

6.1 Conclusion scientifique

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons sélectionné deux bio-médicaments candidats à l'encapsulation en vue d'une future administration par voie orale : l'insuline et l'héparine.

Ainsi, la première étape a consisté à valider les outils analytiques utilisés notamment pour quantifier l'insuline au sein de notre système d'encapsulation. Pour ce faire, nous avons adapté une méthode de quantification de l'insuline décrite dans la monographie de la Pharmacopée Européenne.

Sur la base de cette méthode de quantification validée, nous avons donc travaillé sur une formulation orale basée sur un système de double encapsulation nanoparticulaire avec pour objectif d'optimiser la biodisponibilité de l'insuline et ainsi démontrer son efficacité biologique.

De ce fait, une première étude partielle visait à étudier la charge de surface des NPs. Dans un contexte bibliographique pour le moins contradictoire, nos travaux soulignent l'impact positif d'une charge de surface négative sur l'absorption intestinale *in vitro* et la bio-efficacité *in vivo* chez le rongeur diabétique.

Malgré cette bio-efficacité du système démontrée, des phases d'optimisation supplémentaires restaient nécessaires visant à améliorer la biodisponibilité du système afin de limiter la perte importante d'insuline en milieu intestinal.

La seconde étude a donc consisté à travailler sur cette perte d'insuline. Ainsi, grâce à une matrice d'acide hyaluronique, nous avons réduit considérablement la perte d'insuline tout en conservant une bonne absorption des NPs de par sa charge de surface négative et ses propriétés polysaccharidiques améliorant le passage intestinal des NPs dans certaines études. A ce stade, l'objectif est donc d'optimiser ce système recouvert de cette matrice en vue d'une future administration *in vivo* chez le rat afin de confirmer une meilleure biodisponibilité de l'insuline encapsulée.

Enfin, la troisième étude a consisté à transposer ce système nanoparticulaire à un autre bio-médicament qu'est l'héparine, administrée actuellement sous forme parentérale dans le traitement des maladies thromboemboliques veineuses. Ainsi, il a été mis en évidence des propriétés physico-chimiques proches de celles obtenues avec l'insuline. Par ailleurs, aucune

influence de la taille de l'héparine encapsulée n'a été relevée. En revanche, contrairement à l'insuline, l'héparine semble être localisée en surface de la NPs au vu de la charge de surface. Des études plus approfondies sur la surface des NPs permettraient de définir où se situe exactement le principe actif. De plus, il semblerait que ces NPs soient absorbées au niveau intestinal démontré par des tests *in vitro* qui doivent tout de même être validés définitivement. Cette validation réalisée, ces nanoparticules pourront ensuite être administrées *in vivo* chez le petit animal sein puis chez un modèle pathologique de thrombose.

6.2 Perspectives

Ces travaux de transposition du système à l'héparine nous ont amené à nous questionner sur la capacité d'encapsulation de notre système à travers différents points. D'abord, les travaux menés avec les différents types d'insulines nous ont montré l'impact de la concentration d'un même principe actif sur le système d'encapsulation, provoquant une instabilité du système en présence d'une forte concentration d'insuline. De plus, selon le type de principe actif, une forte concentration pourrait également modifier la viscosité de la solution et donc jouer sur l'efficacité d'encapsulation.

Mais d'autres facteurs comme la taille pourraient également influencer le système. Afin de tester ces paramètres, une étude est actuellement en cours afin de déterminer l'impact de la taille des protéines sur l'efficacité d'encapsulation. Cette étude comporte l'encapsulation à la fois d'un peptide type RGD (Arginylglycylaspartic, 346 Da) ou encore FMLP (*N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, 437 Da), l'encapsulation d'une protéine de haut poids moléculaire comme la BSA (66000 Da) voir également l'encapsulation d'anticorps comme les immunoglobulines M (IgM) (1000kDa) afin de tester un éventail important de tailles à différentes concentrations.

D'un autre point de vue, la transposition à l'héparine nous a également permis de mettre en évidence l'effet de la nature du principe actif pouvant ainsi jouer sur la charge ou encore sur le « burst release » intestinal influençant directement l'efficacité du système final. C'est donc en ce sens qu'une étude a été réalisée sur des molécules de nature non protéique comme l'arsenic ou encore la caféine qui ont été testées et ont montré une faible efficacité d'encapsulation au sein de notre système. En effet, la nature non protéique de ces molécules a entraîné l'apparition d'un autre paramètre influant qui est la polarité des molécules et donc

la solubilité dans chacune des phases de l'émulsion. La nature plus ou moins hydrophile des principes actifs fait entrer en jeu la notion de coefficient de partage (comportement entre deux phases à l'équilibre) où celui-ci varie selon le type de solvant utilisé pour dissoudre le polymère. Ainsi, pour la caféine, celle-ci semble être distribuée en proportions 50/50 entre les deux phases. Une solution pourrait être alors de jouer sur la pression osmotique (saturation en sels) afin de piéger le principe actif.

Il est vrai qu'un principe actif de nature lipophile ne peut actuellement pas être encapsulé au sein de notre système sans une importante mise au point. Cette mise au point peut aller de la nature des surfactants ou du polymère au temps ou encore à la puissance d'agitation afin de créer cette fois une émulsion inverse (huile dans eau).

Cette mise au point a fait l'objet de mon travail de master qui a consisté à encapsuler au sein d'un système d'émulsion huile dans eau, un composé gras. Ce travail a permis de confirmer l'importance de ces différents paramètres sur les propriétés physico-chimiques ainsi que sur la stabilité du système.

Malgré les études en cours, de nombreuses questions restent en suspens sur la capacité d'encapsulation de notre système qu'il faudra résoudre afin d'exploiter au maximum ses capacités.

7 Conclusion générale

L'être vivant est fait de ressources naturelles dont le potentiel thérapeutique semble infini. L'industrie pharmaceutique l'a bien compris et c'est donc en ce sens qu'une nouvelle génération de médicaments a vu le jour sur le marché : **les bio-médicaments**.

De par leurs propriétés (sélectivité, efficacité), les bio-médicaments révolutionnent depuis quelques années le secteur pharmaceutique. D'ailleurs, on estime que demain, plus de 50 % de nos traitements seront d'origine « biologique ». En effet, les bio-médicaments restent pour la plupart des références dans leur domaine thérapeutique.

Leur principal inconvénient ? Leur structure complexe rendant leur administration obligatoire par voie parentérale qui reste un inconvénient contrairement à la voie orale qui est aujourd'hui la voie d'administration apportant le plus de confort et la mieux acceptée pour le patient.

C'est pourquoi, les industries de santé se penchent de plus en plus sur le développement de nouvelles stratégies de formulation orale pour les bio-médicaments, enjeu majeur avec comme objectif, l'amélioration de la prise en charge et de la qualité de vie des patients. En ce sens, nous avons élaboré une stratégie basée sur un changement de voie d'administration de certains bio-médicaments injectables. Les stratégies les plus avancées (actuellement en phases cliniques) se basent sur l'utilisation de promoteurs d'absorption intestinale (ex : ORAMED®, Diabetology Ltd) ou encore des modifications chimiques de l'insuline (ex : Biocon®). Cependant, la plupart des données cliniques publiées récemment ont été conduites ou arrêtées il y a maintenant quelques années, représentant un indicateur clair de la difficulté pour ces laboratoires à transposer ces technologies vers le patient.

C'est pourquoi, les technologies les plus récentes optent principalement pour des systèmes d'encapsulation utilisant les nanotechnologies. L'idée de base est donc séduisante : elle permet à la fois de regrouper les traitements de demain que sont les bio-médicaments et une des « nouvelles technologies », la nanoscience par le biais de la nano-encapsulation afin comme objectif *in fine* d'améliorer la relation du patient avec son traitement. De plus ces technologies d'encapsulation ont un avantage certain : leur potentiel de modulation infini (greffage, modification des propriétés physico-chimiques...).

Mais à l'heure actuelle, ces systèmes à l'échelle nanométrique peuvent présenter des risques et des problèmes éthiques associés. En effet, nous n'avons actuellement pas le recul

nécessaire pour connaître la toxicité de ces systèmes due à l'accumulation de ces dites « nanoparticules » au sein de notre organisme. On a ainsi pu le constater par exemple avec le scandale des nanoparticules de dioxyde de titane présentes dans de nombreux produits du quotidien.

En ce sens, il est donc important de prendre conscience que la formulation de ce type de systèmes doit se faire à base de produits biocompatibles comme c'est le cas avec notre système de nanoparticules de PLGA afin demain de pouvoir administrer avec le plus de sécurité possible les bio-médicaments d'intérêt tels que l'insuline ou l'héparine exposés au cours de ces travaux.

Ainsi grâce à l'encapsulation de ces molécules au sein de notre système, même si la stratégie n'est aujourd'hui pas de remplacer toutes les prises quotidiennes si nous restons réalistes, elle pourrait tout de même permettre de réduire le nombre d'injections et ainsi améliorer la qualité de vie du patient. Ces travaux en sont donc une des nombreuses étapes à franchir pour y parvenir.

8 Bibliographie

Abbott, J., Dodd, M., and Webb, A.K. (1996). Health perceptions and treatment adherence in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 51, 1233-1238

Agarwal, V., Nazzal, S., Reddy, I.K., and Khan, M.A. (2001). Transport studies of insulin across rat jejunum in the presence of chicken and duck ovomucoids. *J Pharm Pharmacol* 53, 1131-1138

Akhtar, F., Wan, X., Wu, G., Kesse, S., Wang, S. and He., S (2018). Low-Molecular-Weight Heparins: Reduced Size Particulate Systems for Improved Therapeutic Outcomes. *Molecules* 23, 1757

Alatri, A., Calanca, L., Tomson, D., and Mazzolai, L. (2012). [Prevention of post-thrombotic syndrome]. *Rev Med Suisse* 8, 311-314

Alfadhli, E.M. (2015). Gestational diabetes mellitus. *Saudi Med J* 36, 399-406.10.15537/smj.2015.4.10307

Almalki, M.H., Altuwaijri, M.A., Almehtel, M.S., Sirrs, S.M., and Singh, R.S. (2012). Subcutaneous versus intraperitoneal insulin for patients with diabetes mellitus on continuous ambulatory peritoneal dialysis: meta-analysis of non-randomized clinical trials. *Clin Invest Med* 35, E132-143

Anderberg, E.K., Nystrom, C., and Artursson, P. (1992). Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 81, 879-887

Araujo, P., Janagap, S., and Holen, E. (2012). Application of Doehlert uniform shell designs for selecting optimal amounts of internal standards in the analysis of prostaglandins and leukotrienes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1260, 102-110.10.1016/j.chroma.2012.08.056

Atreja, A., Bellam, N., and Levy, S.R. (2005). Strategies to enhance patient adherence: making it simple. *MedGenMed* 7, 4

Bai, S.G., V.; Ahsan.F. (2010). Cationic Liposomes as Carriers for Aerosolized Formulations of an Anionic Drug: Safety and Efficacy Study. *Eur J Pharm Sci*, 165–171

Bakhru, S.H., Furtado, S., Morello, A.P., and Mathiowitz, E. (2013). Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 811-821.10.1016/j.addr.2013.04.006

Bannunah, A.M., Villasaliu, D., Lord, J., and Stolnik, S. (2014). Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol Pharm* 11, 4363-4373.10.1021/mp500439c

- Baughman, R.A., Kapoor, S.C., Agarwal, R.K., Kisicki, J., Catella-Lawson, F., and FitzGerald, G.A.** (1998). Oral delivery of anticoagulant doses of heparin. A randomized, double-blind, controlled study in humans. *Circulation* 98, 1610-1615
- Bayat, A., Larijani, B., Ahmadian, S., Junginger, H.E., and Rafiee-Tehrani, M.** (2008). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. *Nanomedicine* 4, 115-120.10.1016/j.nano.2008.01.003
- Berkowitz, S.D., Marder, V.J., Kosutic, G., and Baughman, R.A.** (2003). Oral heparin administration with a novel drug delivery agent (SNAC) in healthy volunteers and patients undergoing elective total hip arthroplasty. *J Thromb Haemost* 1, 1914-1919
- Bernkop-Schnurch, A.** (2005). Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1569-1582.10.1016/j.addr.2005.07.002
- Bilati, U., Allemann, E., and Doelker, E.** (2005). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method--processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *J Microencapsul* 22, 205-214.10.1080/02652040400026442
- Boddupalli, B.M., Mohammed, Z.N., Nath, R.A., and Banji, D.** (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res* 1, 381-387.10.4103/0110-5558.76436
- Bosworth, H.B., Granger, B.B., Mendys, P., Brindis, R., Burkholder, R., Czajkowski, S.M., Daniel, J.G., Ekman, I., Ho, M., Johnson, M., et al.** (2011). Medication adherence: a call for action. *Am Heart J* 162, 412-424.10.1016/j.ahj.2011.06.007
- Boulenc, X., Marti, E., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., and Fabre, G.** (1993). Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human CACO-2 monolayers model. *Biochem Pharmacol* 46, 1591-1600
- Brange, J., and Langkjoer, L.** (1993). Insulin structure and stability. *Pharm Biotechnol* 5, 315-350
- Bueno, L.** (2010). Regulatory mechanisms of tight junctions permeability of gut epithelial cells. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 45, 72-77
- Chalasanani, K.B., Russell-Jones, G.J., Yandrapu, S.K., Diwan, P.V., and Jain, S.K.** (2007). A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. *J Control Release* 117, 421-429.10.1016/j.jconrel.2006.12.003
- Chen, M.C., Sonaje, K., Chen, K.J., and Sung, H.W.** (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials* 32, 9826-9838.10.1016/j.biomaterials.2011.08.087

Chen, Y., Li, P., Modica, J.A., Drout, R.J., and Farha, O.K. (2018). Acid-Resistant Mesoporous Metal-Organic Framework toward Oral Insulin Delivery: Protein Encapsulation, Protection, and Release. *J Am Chem Soc* 140, 5678-5681.10.1021/jacs.8b02089

Chen, Z., Caulfield, M.P., McPhaul, M.J., Reitz, R.E., Taylor, S.W., and Clarke, N.J. (2013). Quantitative insulin analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a high-throughput clinical laboratory. *Clin Chem* 59, 1349-1356.10.1373/clinchem.2012.199794

Chia, J.S.J., McRae, J.L., Kukuljan, S., Woodford, K., Elliott, R.B., Swinburn, B., and Dwyer, K.M. (2017). A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes. *Nutr Diabetes* 7, e274.10.1038/nutd.2017.16

Choi, K.Y., Chung, H., Min, K.H., Yoon, H.Y., Kim, K., Park, J.H., Kwon, I.C., and Jeong, S.Y. (2010). Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials* 31, 106-114.10.1016/j.biomaterials.2009.09.030

Chung, H.J., Kim, H.K., Yoon, J.J., and Park, T.G. (2006). Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery. *Pharm Res* 23, 1835-1841.10.1007/s11095-006-9039-9

Clement, S., Dandona, P., Still, J.G., and Kosutic, G. (2004). Oral modified insulin (HIM2) in patients with type 1 diabetes mellitus: results from a phase I/II clinical trial. *Metabolism* 53, 54-58

Clement, S., Still, J.G., Kosutic, G., and McAllister, R.G. (2002). Oral insulin product hexyl-insulin monoconjugate 2 (HIM2) in type 1 diabetes mellitus: the glucose stabilization effects of HIM2. *Diabetes Technol Ther* 4, 459-466.10.1089/152091502760306544

Cortes, H., Alcala-Alcala, S., Avalos-Fuentes, A., Mendoza-Munoz, N., Quintanar-Guerrero, D., Leyva-Gomez, G., and Floran, B. (2017). Nanotechnology As Potential Tool for siRNA Delivery in Parkinson's Disease. *Curr Drug Targets* 18, 1866-1879.10.2174/1389450118666170321130003

Crucho, C.I.C., and Barros, M.T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 80, 771-784.10.1016/j.msec.2017.06.004

Czuba, E., Diop, M., Mura, C., Schaschkow, A., Langlois, A., Bietiger, W., Neidl, R., Virciglio, A., Auberval, N., Julien-David, D., et al. (2018). Oral insulin delivery, the challenge to increase insulin bioavailability: Influence of surface charge in nanoparticle system. *Int J Pharm* 542, 47-55.10.1016/j.ijpharm.2018.02.045

D'Adamo, E., and Caprio, S. (2011). Type 2 diabetes in youth: epidemiology and pathophysiology. *Diabetes Care* 34 Suppl 2, S161-165.10.2337/dc11-s212

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., and Preat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 161, 505-522.10.1016/j.jconrel.2012.01.043

DeBrincat, M. (2012). Medication adherence: patient education, communication and behaviour. *Journal of the Malta College of Pharmacy Practice* 3-5

Degim, I.T., Gumusel, B., Degim, Z., Ozcelikay, T., Tay, A., and Guner, S. (2006). Oral administration of liposomal insulin. *J Nanosci Nanotechnol* 6, 2945-2949

Delavenne, X. (2013). [New oral anticoagulant pharmacology]. *Presse Med* 42, 1206-1212.10.1016/j.lpm.2013.06.008

Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., and Atyabi, F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine* 6, 877-895.10.2147/IJN.S18905

Ding, C., and Li, Z. (2017). A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 76, 1440-1453.10.1016/j.msec.2017.03.130

Diop, M., Auberval, N., Viciglio, A., Langlois, A., Bietiger, W., Mura, C., Peronet, C., Bekel, A., Julien David, D., Zhao, M., et al. (2015). Design, characterisation, and bioefficiency of insulin-chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking. *Int J Pharm* 491, 402-408.10.1016/j.ijpharm.2015.05.065

Duceppe, N., and Tabrizian, M. (2009). Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. *Biomaterials* 30, 2625-2631.10.1016/j.biomaterials.2009.01.017

Elalamy, I. (2010). Héparines: structure, propriétés pharmacologiques et activités. *Hématologie* 13-022-D10

Ensign, L.M., Cone, R., and Hanes, J. (2012). Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev* 64, 557-570.10.1016/j.addr.2011.12.009

European-Pharmacopoeia-9.5 European Pharmacopoeia 9.5 essai de dissolution des formes solides

Fan, B., Xing, Y., Zheng, Y., Sun, C., and Liang, G. (2016). pH-responsive thiolated chitosan nanoparticles for oral low-molecular weight heparin delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Deliv* 23, 238-247.10.3109/10717544.2014.909908

Farsaei, S., Radfar, M., Heydari, Z., Abbasi, F., and Qorbani, M. (2014). Insulin adherence in patients with diabetes: risk factors for injection omission. *Prim Care Diabetes* 8, 338-345.10.1016/j.pcd.2014.03.001

Flevas D., Megaloikononimos, P., Dimopoulos, L., Misiokapa, E., Koulouvaris P. and Mavrojenis A. (2018). Thromboembolism prophylaxis in orthopaedics: an update. *Effort open reviews* 3, 130-142

Foged, C., Brodin, B., Frokjaer, S., and Sundblad, A. (2005). Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 298, 315-322.10.1016/j.ijpharm.2005.03.035

Gao, X., and Chorover, J. (2010). Adsorption of sodium dodecyl sulfate (SDS) at ZnSe and alpha-Fe₂O₃ surfaces: combining infrared spectroscopy and batch uptake studies. *J Colloid Interface Sci* 348, 167-176.10.1016/j.jcis.2010.04.011

Garcia-Perez, L.E., Alvarez, M., Dilla, T., Gil-Guillen, V., and Orozco-Beltran, D. (2013). Adherence to therapies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Ther* 4, 175-194.10.1007/s13300-013-0034-y

Gedawy, A., Martinez, J., Al-Salami, H., and Dass, C.R. (2018). Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies. *J Pharm Pharmacol* 70, 197-213.10.1111/jphp.12852

Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., and Hatton, P.V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci* 15, 3640-3659.10.3390/ijms15033640

Goodall, K.T., Chooi, C.C., and Gallus, A.S. (1980). Heparin stability: effects of diluent, heparin activity, container, and pH. *J Clin Pathol* 33, 1206-1211

Grabowski, N., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Santiago, L.A., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., Tsapis, N., and Fattal, E. (2013). Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *Int J Pharm* 454, 686-694.10.1016/j.ijpharm.2013.05.025

Gray, E., Mulloy, B., and Barrowcliffe, T.W. (2008). Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 99, 807-818.10.1160/TH08-01-0032

Guarnieri, M.B.T.M.D.L.Z.M.a.K.B. (2014). Subcutaneous implants for long-acting drug therapy in laboratory animals may generate unintended drug reservoirs. *J Pharm Bioallied* 38-42

Hamman, J.H., Enslin, G.M., and Kotze, A.F. (2005). Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs* 19, 165-177

Han, L., Zhao, Y., Yin, L., Li, R., Liang, Y., Huang, H., Pan, S., Wu, C., and Feng, M. (2012). Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *AAPS PharmSciTech* 13, 836-845.10.1208/s12249-012-9807-2

Hanslik, T., and Prinseau, J. (2004). The use of vitamin K in patients on anticoagulant therapy: a practical guide. *Am J Cardiovasc Drugs* 4, 43-55

Heinemann, L., and Jacques, Y. (2009). Oral insulin and buccal insulin: a critical reappraisal. *J Diabetes Sci Technol* 3, 568-584.10.1177/193229680900300323

Hinds, K.D., Campbell, K.M., Holland, K.M., Lewis, D.H., Piche, C.A., and Schmidt, P.G. (2005). PEGylated insulin in PLGA microparticles. In vivo and in vitro analysis. *J Control Release* 104, 447-460.10.1016/j.jconrel.2005.02.020

Hirsh, J., and Levine, M.N. (1992). Low molecular weight heparin. *Blood* 79, 1-17

Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C., and Ubrich, N. (2006). Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *J Control Release* 113, 38-42.10.1016/j.jconrel.2006.03.020

Hoffart, V., Ubrich, N., Simonin, C., Babak, V., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T., and Maincent, P. (2002). Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: formulation, characterization, and release characteristics. *Drug Dev Ind Pharm* 28, 1091-1099.10.1081/DDC-120014576

Hoier, R., and Jensen, A.L. (1993). Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of insulin in dogs. *Zentralbl Veterinarmed A* 40, 26-32

Ibrahim, S.S.O., R.; Awad, G.A.S.; Mortada, N.D.; Geneidy, A.S.; (2016). Low molecular weight heparins for current and future uses: approaches for micro- and nano-particulate delivery. *Drug Delivery* 23

ICHQ2(R1) (2005). ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., and Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int J Pharm* 496, 173-190.10.1016/j.ijpharm.2015.10.057

Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Kakemi, M., Morimoto, K., Yamashita, S., Namba, Y., and Oku, N. (1999). Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. *J Pharm Sci* 88, 248-252.10.1021/js980235x

Iyer, H., Khedkar, A., and Verma, M. (2010). Oral insulin - a review of current status. *Diabetes Obes Metab* 12, 179-185.10.1111/j.1463-1326.2009.01150.x

Jameela, S.R., Suma, N., and Jayakrishnan, A. (1997). Protein release from poly(epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques: a comparative study. *J Biomater Sci Polym Ed* 8, 457-466

Jiao, Q.C., Liu, Q., Sun, C., and He, H. (1999). Investigation on the binding site in heparin by spectrophotometry. *Talanta* 48, 1095-1101

Jiao, Y., Ubrich, N., Hoffart, V., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., and

Maincent, P. (2002). Anticoagulant activity of heparin following oral administration of heparin-loaded microparticles in rabbits. *J Pharm Sci* 91, 760-768

Jiao, Y.Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., and Maincent, P. (2001). Preparation and in vitro evaluation of heparin-loaded polymeric nanoparticles. *Drug Deliv* 8, 135-141.10.1080/107175401316906892

Jimmy, B., and Jose, J. (2011). Patient medication adherence: measures in daily practice. *Oman Med J* 26, 155-159.10.5001/omj.2011.38

Jin, J., Sklar, G.E., Min Sen Oh, V., and Chuen Li, S. (2008). Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective. *Ther Clin Risk Manag* 4, 269-286

Jin, J.F., Zhu, L.L., Chen, M., Xu, H.M., Wang, H.F., Feng, X.Q., Zhu, X.P., and Zhou, Q. (2015). The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Prefer Adherence* 9, 923-942.10.2147/PPA.S87271

Jogala, S., Rachamalla, S.S., and Aukunuru, J. (2015). Development of subcutaneous sustained release nanoparticles encapsulating low molecular weight heparin. *J Adv Pharm Technol Res* 6, 58-64.10.4103/2231-4040.154531

Keles, H.N., A.; Clegg, F.; Sammon, C.; (2015). Investigation of factors influencing the hydrolytic degradation of single PLGA microparticles. *Polymer Degradation and Stability* 119, 228-241

Kelloway, J.S., Wyatt, R.A., and Adlis, S.A. (1994). Comparison of patients' compliance with prescribed oral and inhaled asthma medications. *Arch Intern Med* 154, 1349-1352

Kettler, L.J., Sawyer, S.M., Winefield, H.R., and Greville, H.W. (2002). Determinants of adherence in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 57, 459-464

Kim, S.K., Lee, D.Y., Lee, E., Lee, Y.K., Kim, C.Y., Moon, H.T., and Byun, Y. (2007). Absorption study of deoxycholic acid-heparin conjugate as a new form of oral anti-coagulant. *J Control Release* 120, 4-10.10.1016/j.jconrel.2007.03.008

Koocher, G.P., McGrath, M.L., and Gudas, L.J. (1990). Typologies of nonadherence in cystic fibrosis. *J Dev Behav Pediatr* 11, 353-358

Kumari, A., Yadav, S.K., and Yadav, S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 75, 1-18.10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

Lai, C.K., Lu, Y.L., Hsieh, J.T., Tsai, S.C., Feng, C.L., Tsai, Y.S., Tsai, P.C., Su, H.L., Lin, Y.H., and Lai, C.H. (2014). Development of chitosan/heparin nanoparticle-encapsulated cytolethal distending toxin for gastric cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)* 9, 803-817.10.2217/nnm.13.54

- Lamichhane, S.P., Arya, N., Ojha, N., Kohler, E., and Shastri, V.P.** (2015). Glycosaminoglycan-functionalized poly-lactide-co-glycolide nanoparticles: synthesis, characterization, cytocompatibility, and cellular uptake. *Int J Nanomedicine* 10, 775-789.10.2147/IJN.S73508
- Lamouroux, A., Magnan, A., and Vervloet, D.** (2005). [Compliance, therapeutic observance and therapeutic adherence: what do we speak about?]. *Rev Mal Respir* 22, 31-34
- Lamprecht, A.K., P.; Ubrich,N; Maincent,P.; Neumann,D.;** (2006). Low molecular weight heparin nanoparticles: mucoadhesion and behaviour in Caco-2 cells. *Nanotechnology*, 17
- Lasalle, V.L.P., S.; Rueda,E.; Ferreira,M.L.** (2011). An accurate UV/visible method to quantify proteins and enzymes: Impact of aggregation, buffer concentration and the nature of the standard. *Current Topics in Analytical Chemistry*
- Lask, B.** (1994). Non-adherence to treatment in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 87 Suppl 21, 25-27
- Lee, G.Y., Kim, J.H., Choi, K.Y., Yoon, H.Y., Kim, K., Kwon, I.C., Choi, K., Lee, B.H., Park, J.H., and Kim, I.S.** (2015). Hyaluronic acid nanoparticles for active targeting atherosclerosis. *Biomaterials* 53, 341-348.10.1016/j.biomaterials.2015.02.089
- Lee, S.I., and Narendran, P.** (2014). Intraperitoneal insulin therapy for a patient with type 1 diabetes with insulin injection site inflammation. *BMJ Case Rep* 2014.10.1136/bcr-2014-205278
- Lee, Y., Kim, S.H., and Byun, Y.** (2000). Oral delivery of new heparin derivatives in rats. *Pharm Res* 17, 1259-1264
- Li, X., Qi, J., Xie, Y., Zhang, X., Hu, S., Xu, Y., Lu, Y., and Wu, W.** (2013). Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *Int J Nanomedicine* 8, 23-32.10.2147/IJN.S38507
- Liu, L., Fishman, M.L., Kost, J., and Hicks, K.B.** (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials* 24, 3333-3343
- Liu, Q.J., G.;** (1998). Mechanism of methylene blue action and interference in the heparin assay. *Spectroscopy letters: an international journal for rapid communication*, 913-924
- Loike, J.D., and Silverstein, S.C.** (1983). A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages. *J Immunol Methods* 57, 373-379
- Lopes, M., Shrestha, N., Correia, A., Shahbazi, M.A., Sarmiento, B., Hirvonen, J., Veiga, F., Seica, R., Ribeiro, A., and Santos, H.A.** (2016). Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *J Control Release* 232, 29-41.10.1016/j.jconrel.2016.04.012

Lopes, M.A., Abrahim, B.A., Cabral, L.M., Rodrigues, C.R., Seica, R.M., de Baptista Veiga, F.J., and Ribeiro, A.J. (2014). Intestinal absorption of insulin nanoparticles: contribution of M cells. *Nanomedicine* 10, 1139-1151.10.1016/j.nano.2014.02.014

Lundquist, P., and Artursson, P. (2016). Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 106, 256-276.10.1016/j.addr.2016.07.007

Lybecker, K.M. (2004). The economic fundamentals of the U.S. pharmaceutical market. *Manag Care* 13, 7-9; discussion 12-13, 41-12

Makadia, H.K., and Siegel, S.J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 3, 1377-1397.10.3390/polym3031377

Malathi, S., Nandhakumar, P., Pandiyan, V., Webster, T.J., and Balasubramanian, S. (2015). Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. *Int J Nanomedicine* 10, 2207-2218.10.2147/IJN.S67947

Mansuri, S.K., P.; Jain, K.; Tekade, R.K.; Jain N.K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and functional polymers* 100, 151-172

Masahiro Hayashi, M.T., Shoji Awazu (1997). Transcellular and paracellular contribution to transport processes in the colorectal route. *Advanced Drug Delivery Reviews Volume 28*, , 191-204

McClements, D.J., DeLoid, G., Pyrgiotakis, G., Shatkin, J.A., Xiao, H., and Demokritou, P. (2016). The Role of the Food Matrix and Gastrointestinal Tract in the assessment of biological properties of ingested engineered nanomaterials (iENMs): State of the science and knowledge gaps. *NanoImpact* 3-4, 47-57.10.1016/j.impact.2016.10.002

McNamara, P.S., McCormack, P., McDonald, A.J., Heaf, L., and Southern, K.W. (2009). Open adherence monitoring using routine data download from an adaptive aerosol delivery nebuliser in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 8, 258-263.10.1016/j.jcf.2009.04.006

Mishra, D., Hubenak, J.R., and Mathur, A.B. (2013). Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy. *J Biomed Mater Res A* 101, 3646-3660.10.1002/jbm.a.34642

Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G250-254.10.1152/ajpgi.2000.279.2.G250

Moazed, B., and Hiebert, L.M. (2007). An in vitro study with an ussing chamber showing that unfractionated heparin crosses rat gastric mucosa. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 299-305.10.1124/jpet.106.116939

Modi, A.C., Lim, C.S., Yu, N., Geller, D., Wagner, M.H., and Quittner, A.L. (2006). A multi-method assessment of treatment adherence for children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 5, 177-185.10.1016/j.jcf.2006.03.002

Muheem, A., Shakeel, F., Jahangir, M.A., Anwar, M., Mallick, N., Jain, G.K., Warsi, M.H., and Ahmad, F.J. (2016). A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharm J* 24, 413-428.10.1016/j.jsps.2014.06.004

Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F., and Lehr, C.M. (2007). Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine* 3, 173-183.10.1016/j.nano.2007.03.006

Nicoll, L.H., and Hesby, A. (2002). Intramuscular injection: an integrative research review and guideline for evidence-based practice. *Appl Nurs Res* 15, 149-162

Oh, E.J., Park, K., Kim, K.S., Kim, J., Yang, J.A., Kong, J.H., Lee, M.Y., Hoffman, A.S., and Hahn, S.K. (2010). Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J Control Release* 141, 2-12.10.1016/j.jconrel.2009.09.010

Osterberg, L., and Blaschke, T. (2005). Adherence to medication. *N Engl J Med* 353, 487-497.10.1056/NEJMra050100

Owens, D.R. (2002). New horizons--alternative routes for insulin therapy. *Nat Rev Drug Discov* 1, 529-540.10.1038/nrd836

Oyarzun-Ampuero, F.A., Brea, J., Loza, M.I., Torres, D., and Alonso, M.J. (2009). Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *Int J Pharm* 381, 122-129.10.1016/j.ijpharm.2009.04.009

Patel, B., Gupta, V., and Ahsan, F. (2012). PEG-PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin. *J Control Release* 162, 310-320.10.1016/j.jconrel.2012.07.003

Pazzini, C., Marcato, P.D., Prado, L.B., Alessio, A.M., Hoehr, N.F., Montalvao, S., Paixao, D., Duran, N., and Annichino-Bizzacchi, J.M. (2015). Polymeric Nanoparticles of Enoxaparin as a Delivery System: In Vivo Evaluation in Normal Rats and in a Venous Thrombosis Rat Model. *J Nanosci Nanotechnol* 15, 4837-4843

Petitou, M., Duchaussoy, P., Driguez, P.A., Herault, J.P., Lormeau, J.C., and Herbert, J.M. (1999a). New synthetic heparin mimetics able to inhibit thrombin and factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 1155-1160

Petitou, M., Herault, J.P., Bernat, A., Driguez, P.A., Duchaussoy, P., Lormeau, J.C., and Herbert, J.M. (1999b). [New antithrombotic oligosaccharides]. *Ann Pharm Fr* 57, 232-239

Pharmacopoeia-8.0, E. (2008). European pharmacopoeia 8.0, 20246, chromatographic separation techniques.

Pharmacopoeia-8.0, E. (2014). European pharmacopoeia human insulin 8.0, 0838.

Plapied, L., Vandermeulen, G., Vroman, B., Preat, V., and des Rieux, A. (2010). Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery. *Int J Pharm* 398, 210-218.10.1016/j.ijpharm.2010.07.041

Qian, Y., ZHANG, L.J.; WU,Z.M.; ZHOU, L.Y.; Jiang, W.; Ling, L.; Luo, L.; GUO,X.D. (2013). Enteric-coated capsule containing cationic nanoparticles for oral insulin delivery (USA).

Quaranta, M., Erez, O., Mastrolia, S.A., Koifman, A., Leron, E., Eshkoli, T., Mazor, M., and Holcberg, G. (2015). The physiologic and therapeutic role of heparin in implantation and placentation. *PeerJ* 3, e691.10.7717/peerj.691

Ramalingam, P., and Ko, Y.T. (2016). Improved oral delivery of resveratrol from N-trimethyl chitosan-g-palmitic acid surface-modified solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 139, 52-61.10.1016/j.colsurfb.2015.11.050

Ranjit, K.B., A.A; (2013). Nanoparticle: an overview of preparation and characterization. *International research journal of pharmacy*

Rashid, Q., Abid, M., and Jairajpuri, M.A. (2014). Elucidating the specificity of non-heparin-based conformational activators of antithrombin for factor Xa inhibition. *J Nat Sci Biol Med* 5, 36-42.10.4103/0976-9668.127282

Reix, N., Guhmann, P., Bietiger, W., Pinget, M., Jeandidier, N., and Sigrist, S. (2012a). Duodenum-specific drug delivery: in vivo assessment of a pharmaceutically developed enteric-coated capsule for a broad applicability in rat studies. *Int J Pharm* 422, 338-340.10.1016/j.ijpharm.2011.10.017

Reix, N., Parat, A., Seyfritz, E., Van der Werf, R., Epure, V., Ebel, N., Danicher, L., Marchioni, E., Jeandidier, N., Pinget, M., et al. (2012b). In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* 437, 213-220.10.1016/j.ijpharm.2012.08.024

Sajeesh, S., Bouchemal, K., Sharma, C.P., and Vauthier, C. (2010). Surface-functionalized polymethacrylic acid based hydrogel microparticles for oral drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 74, 209-218.10.1016/j.ejpb.2009.09.001

Sandeep Kumar, N.D., Ruma Rani, Gaurav Bhanjana (2012). Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *BioNanoScience*

Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Zerrouk, N., and Caramella, C. (2004). Mucoadhesive and penetration enhancement properties of three grades of hyaluronic acid using porcine buccal and vaginal tissue, Caco-2 cell lines, and rat jejunum. *J Pharm Pharmacol* 56, 1083-1090.10.1211/0022357044085

Santander-Ortega, M.J., Bastos-Gonzalez, D., Ortega-Vinuesa, J.L., and Alonso, M.J. (2009). Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization. *J Biomed Nanotechnol* 5, 45-53

Saptarshi, S.R., Duschl, A., and Lopata, A.L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology* 11, 26.10.1186/1477-3155-11-26

Sarmiento, B., Martins, S., Ferreira, D., and Souto, E.B. (2007). Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2, 743-749

Schimpel, C., Teubl, B., Absenger, M., Meindl, C., Frohlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A., and Roblegg, E. (2014). Development of an advanced intestinal in vitro triple culture permeability model to study transport of nanoparticles. *Mol Pharm* 11, 808-818.10.1021/mp400507g

Schliecker, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Wombacher, R., and Kissel, T. (2003). Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *Int J Pharm* 266, 39-49

Sekhon, B.S. (2013). Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects. *Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management* 1, 11-36

Sequeira J; Santos A, S.J., Veiga F, Ribeiro A (2018). Chapter 10 - Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants. *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications*, 375-402

Shahbazi, M.A., Hamidi, M., and Mohammadi-Samani, S. (2013). Preparation, optimization, and in-vitro/in-vivo/ex-vivo characterization of chitosan-heparin nanoparticles: drug-induced gelation. *J Pharm Pharmacol* 65, 1118-1133.10.1111/jphp.12076

Shakweh, M., Ponchel, G., and Fattal, E. (2004). Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 1, 141-163.10.1517/17425247.1.1.141

Sheng, J., Han, L., Qin, J., Ru, G., Li, R., Wu, L., Cui, D., Yang, P., He, Y., and Wang, J. (2015). N-trimethyl chitosan chloride-coated PLGA nanoparticles overcoming multiple barriers to oral insulin absorption. *ACS Appl Mater Interfaces* 7, 15430-15441.10.1021/acsami.5b03555

Smith, J., Wood, E., and Dornish, M. (2004). Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res* 21, 43-49

Sonaje, K., Lin, K.J., Wey, S.P., Lin, C.K., Yeh, T.H., Nguyen, H.N., Hsu, C.W., Yen, T.C., Juang, J.H., and Sung, H.W. (2010). Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: Oral delivery using pH-responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. *Biomaterials* 31, 6849-6858.10.1016/j.biomaterials.2010.05.042

Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., and Rudzinski, W.E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70, 1-20

Sun, S., Liang, N., Yamamoto, H., Kawashima, Y., Cui, F., and Yan, P. (2015). pH-sensitive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle composite microcapsules for oral delivery of insulin. *Int J Nanomedicine* 10, 3489-3498.10.2147/IJN.S81715

Szymanska, E., and Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar Drugs* 13, 1819-1846.10.3390/md13041819

Tarn, D.M., Paterniti, D.A., Kravitz, R.L., Heritage, J., Liu, H., Kim, S., and Wenger, N.S. (2008). How much time does it take to prescribe a new medication? *Patient Educ Couns* 72, 311-319.10.1016/j.pec.2008.02.019

Taverner, A., Dondi, R., Almansour, K., Laurent, F., Owens, S.E., Eggleston, I.M., Fotaki, N., and Mrsny, R.J. (2015). Enhanced paracellular transport of insulin can be achieved via transient induction of myosin light chain phosphorylation. *J Control Release* 210, 189-197.10.1016/j.jconrel.2015.05.270

Thanou, M., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E. (2001a). Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 50 Suppl 1, S91-101

Thanou, M., Verhoef, J.C., and Junginger, H.E. (2001b). Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev* 52, 117-126

Tsai, M.F., and Miller, C. (2013). Substrate selectivity in arginine-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5893-5897.10.1073/pnas.1301442110

Van Itallie, C.A., JM. (2004). The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology* ; 19., 331-338

Vasir, J.K., and Labhsetwar, V. (2008). Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials* 29, 4244-4252.10.1016/j.biomaterials.2008.07.020

Vauthier, C., and Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res* 26, 1025-1058.10.1007/s11095-008-9800-3

Verma, A., and Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6, 12-21.10.1002/smll.200901158

Wang, T., Hou, J., Su, C., Zhao, L., and Shi, Y. (2017). Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles induce ROS-mediated tumor cell apoptosis and enhance antitumor efficiency by targeted drug delivery via CD44. *J Nanobiotechnology* 15, 7.10.1186/s12951-016-0245-2

Weiss, M., Steiner, D.F., and Philipson, L.H. (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In Endotext, L.J.

- Wolf, H.** (1994). Low-molecular-weight heparin. *Med Clin North Am* 78, 733-743
- Xie, J., Li, A., and Li, J.** (2017). Advances in pH-Sensitive Polymers for Smart Insulin Delivery. *Macromol Rapid Commun* 38.10.1002/marc.201700413
- Xing, X., Zhao, X., Ding, J., Liu, D. and Qi, G.** (2018). Enteric-coated insulin microparticles delivered by lipopeptides of iturin and surfactin. *Drug delivery*, 22-34
- Xu, X., and Dai, Y.** (2010). Heparin: an intervenor in cell communication. *J Cell Mol Med* 14, 175-180.10.1111/j.1582-4934.2009.00871.x
- Y. Cottin, L.L., A. Gudjoncik, P. Buffet,, C. Brulliarda, O.H., E. Grégoire,, and F. Germina, M.Z.** (2012). Medication compliance: concepts and determinants. *Archives of Cardiovascular Diseases* 4, 291-298.10.1111/j.1445-5994.2010.02209.x
- Yun, Y., Cho, Y.W., and Park, K.** (2013). Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 822-832.10.1016/j.addr.2012.10.007
- Zeilstra, J., Joosten, S.P., Vermeulen, L., Koster, J., Medema, J.P., Versteeg, R., Spaargaren, M., and Pals, S.T.** (2013). CD44 expression in intestinal epithelium and colorectal cancer is independent of p53 status. *PLoS One* 8, e72849.10.1371/journal.pone.0072849
- Zhang, G.H., R.;Zhan, D; Cong, Y.; Cheng Ja.j.; Fu, J.;** (2013). Fabrication of hollow porous PLGA microspheres for controlled protein release and promotion of cell compatibility. *Chinese Chemical Letters Volume* 24, 710-714
- Zhang, Z.H., Abbad, S., Pan, R.R., Waddad, A.Y., Hou, L.L., Lv, H.X., and Zhou, J.P.** (2013). N-octyl-N-Arginine chitosan micelles as an oral delivery system of insulin. *J Biomed Nanotechnol* 9, 601-609
- Zhou, Y.Y., Du, Y.Z., Wang, L., Yuan, H., Zhou, J.P., and Hu, F.Q.** (2010). Preparation and pharmacodynamics of stearic acid and poly (lactic-co-glycolic acid) grafted chitosan oligosaccharide micelles for 10-hydroxycamptothecin. *Int J Pharm* 393, 143-151.10.1016/j.ijpharm.2010.04.025

9 Publications

Acceptées:

E.Czuba, M.Diop, C.Mura, A.Schaschkow, A.Langlois, W.Bietiger, R.Neidl, A.Virciglio, N.Auberval, D.Julien-David, E.Maillard, Y.Frere^c, E.Marchioni, M.Pinget and S.Sigrist, *Oral insulin delivery, the challenge to increase insulin bioavailability: influence of surface charge in nanoparticle system*, International Journal of Pharmaceutics 542 (2018) 47-55.

E.Czuba, D.Julien-David, Eric Marchioni, Séverine Sigrist, T.Engel, and Martine Bergaentzlé, *Validation of a major mobile phase modification of the LC-UV European Pharmacopoeia method for human insulin assay*, Chromatographia, (soumise dans Journal of liquid chromatography and related technologies).

A soumettre (septembre 2018):

E.Czuba, D.Julien-David, Eric Marchioni, Séverine Sigrist, T.Engel, and Martine Bergaentzlé, Remmelt Van der Werf, Michel Pinget^a and Séverine Sigrist^{a*}, *Validation In vitro of antioxydant effect of fruits and vegetables fatty extract*. (à soumettre dans LWT, Food Science and Technology).

10 Communications orales

E.Czuba, S. Sigrist, E. Marchioni, Y. Frere, E. Maillard, M. Pinget, *The charge effect of insulin PLGA nanoparticles on cell uptake in vitro and bioavailability in vivo* (International conference on biotechnology 2018, Amsterdam, Pays-Bas)

E.Czuba, *insulin encapsulation for an oral administration* (Scientific forum, Lycée Jean Rostand, 2018, Strasbourg, France)

11 Communications affichées

E.Czuba, M.Diop, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, C. Sookhareea, M. Pinget, N. Jeandidier, E. Maillard, E. Marchioni, Y. Frere, S. Sigrist. *New Nanoparticulate systems formulation for oral administration of insulin* (Exchange program 2016, Grenoble, France)

E.Czuba, M.Diop, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, C. Sookhareea, M. Pinget, N. Jeandidier, E. Maillard, E. Marchioni, Y. Frere, S. Sigrist. *Nanoparticulate system: charge effect on cell uptake in vitro and bioavailability in vivo* (international conference on bioencapsulation 2016, Lisbonne, Portugal)

E.Czuba, M.Diop, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, C. Sookhareea, M. Pinget, N. Jeandidier, E. Maillard, E. Marchioni, Y. Frere, S. Sigrist. *Nanoparticulate system formulation: influence of charge on cell uptake and bioavailability* (SFnano 2016, Paris, France)

E.Czuba, M.Diop, E. Maillard, E. Marchioni, Y. Frere, M. Pinget, S. Sigrist. *ORAL INSULIN DELIVERY: charge effect on cell uptake in vitro and bioavailability in vivo* (Eurodiameeting, 2017, Strasbourg, France)

E.Czuba, M.Diop, E. Maillard, Y. Frere, E. Marchioni, M. Pinget, S. Sigrist. *ORAL INSULIN DELIVERY, the challenge to increase insulin bioavailability: influence of surface charge in nanoparticle system* (IDF 2017, Abu-dhabi, EAU)

12 Annexes

- A. Oral insulin delivery, the challenge to increase insulin bioavailability: Influence of surface charge in nanoparticle system
- B. Validation of a major modification of the mobile phase in the European Pharmacopoeia LC-UV human insulin assay
- C. Proposition de révision pour la comission de la pharmacopée Européenne
- D. Nouveau chapitre de la thèse



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Oral insulin delivery, the challenge to increase insulin bioavailability: Influence of surface charge in nanoparticle system



Elodie Czuba^a, Mouhamadou Diop^a, Carole Mura^a, Anais Schaschkow^a, Allan Langlois^a, William Bietiger^a, Romain Neidl^a, Aurélien Virciglio^a, Nathalie Auberval^c, Diane Julien-David^b, Elisa Maillard^a, Yves Frere^c, Eric Marchioni^b, Michel Pinget^a, Séverine Sigrist^{a,*}

^a UMR DIATHEC, EA 7294, Centre Européen d'Etude du Diabète, Université de Strasbourg (UdS), Boulevard René Leriche, 67200 Strasbourg, France

^b Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, faculté de pharmacie, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

^c Institut Charles Sadron (UPR 22 CNRS), 23 rue du Loess, BP 84047 67034 Strasbourg Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Diabetes
Oral administration
Insulin
Nanoparticle
Charge
Bioavailability

ABSTRACT

Oral administration of insulin increases patient comfort and could improve glycemic control thanks to the hepatic first passage. However, challenges remain. The current approach uses poly (D, lactide-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles (NPs), an effective drug carrier system with a long acting profile. However, this system presents a bioavailability of less than 20% for insulin encapsulation. In this context, physico-chemical parameters like surface charge could play a critical role in NP uptake by the intestinal barrier. Therefore, we developed a simple method to modulate NP surface charge to test its impact on uptake *in vitro* and finally on NP efficiency *in vivo*. Various NPs were prepared in the presence (+) or absence (-) of polyvinyl alcohol (PVA), sodium dodecyl sulfate (SDS), and/or coated with chitosan chloride. *In vitro* internalization was tested using epithelial culture of Caco-2 or using a α -culture (Caco-2/RevHT29MTX) by flow cytometry. NPs were then administered by oral route using a pharmaceutical complex vector (100 or 250 UI/kg) in a diabetic rat model.

SDS-NPs (-42 ± 2 mV) were more negatively charged than -PVA-NPs (-22 ± 1 mV) and chitosan-coated NPs were highly positively charged (56 ± 2 mV) compared to +PVA particles (-2 ± 1 mV), which were uncharged. In the Caco-2 model, NP internalization was significantly improved by using negatively charged NPs (SDS NPs) compared to using classical NPs (+PVA NPs) and chitosan-coated NPs. Finally, the efficacy of insulin SDS-NPs was demonstrated *in vivo* (100 or 250 UI insulin/kg) with a reduction of blood glucose levels in diabetic rats. Formulation of negatively charged NPs represents a promising approach to improve NP uptake and insulin bioavailability for oral delivery.

1. Introduction

In recent years, advances have been made in insulin administration for patients with type 1 diabetes to increase patient compliance. However, trauma and discomfort associated with injections lead to poor adherence to the treatment. Various routes of insulin administration have been developed to improve insulin treatment: nasal (Nazar and Tsiouklis, 2012), ocular (Xuan et al., 2005), buccal (Boateng et al., 2014), and oral (Sheng et al., 2015). Oral administration is the best candidate to increase patient comfort (no injection or no device is needed) and to control glucidic homeostasis with a hepatic first passage (Dal et al., 2015), mimicking the physiological path of endogenous insulin secretion. However, oral delivery presents multiple barriers (physical, chemical, and biological) along the digestive tract such as the

stomach and its acid pH, the intestine and its digestive enzymes, and the intestinal barrier with the mucus, which leads to a very low oral bioavailability of proteins such as insulin (Foss and Peppas, 2004).

Many strategies have been developed to increase insulin delivery in the bloodstream after oral administration like chemical structure modification (Naibo Yin et al., 2014), enzyme inhibition (Agarwal et al., 2001), permeation enhancers (Aungst, 2000), and encapsulation systems (Wu et al., 2012). Polymeric nanoparticle (NP) is a promising system to encapsulate drugs and protect them from pH variations and enzymatic attacks, allowing their direct release in the blood. The first step consists in the choice of polymer used to formulate NPs. Chitosan/tripolyphosphate (Diop et al., 2015), alginate/chitosan (Sarmiento et al., 2007), poly(isobutylcyanoacrylate) (Pinto-Alphandary et al., 2003), and poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) (Cui et al., 2007) are

* Corresponding author.
E-mail address: s.sigrist@ceed-diabeto.org (S. Sigrist).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.045>

Received 23 November 2017; Received in revised form 16 February 2018; Accepted 27 February 2018

Available online 06 March 2018

0378-5173/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

currently used to encapsulate insulin. PLGA has the advantage of being approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for drug delivery.

However, two major drawbacks remain: PLGA is a non-enteric polymer (Krishnamachari and Madan, 2007) and the PLGA-NP system presents a low bioavailability, less than 20%, by intraduodenal administration in diabetic rat (Reix et al., 2012a,b), which could be highly influenced by the physicochemical characteristics of NPs.

To solve the gastric environment problem, we developed the double encapsulation principle (patent WO2004096172) based on a gastro-resistant carrier protecting insulin in the stomach and containing PLGA NPs. Regarding the first encapsulation level, many carriers have been developed. For example, Yu et al., (2015) and Reix et al. (2012a,b) developed and validated *in vivo* gastroresistant capsules covered with eudragit® L100-55, a copolymer commonly used to confer enteric properties to drugs (Li et al., 2006). This copolymer is insoluble in an acid medium and in water, but entero-soluble by deprotonation from a pH of about 6 and above (Hardy et al., 1987). Because of this property, PLGA is degraded as the capsule exits the stomach, at the duodenum level. Similarly, Poncelet et al. (1998) developed alginate beads, produced with non-toxic reagents and with resistance to acid pH due to alginate, which could be used to protect active ingredients in a gastric environment.

Then, carrying insulin, PLGA NPs formulated with double emulsion technic were chosen because this system is simple and proved its efficiency in many systems (Danhier et al., 2012; Sheng et al., 2015) and presents a low bioavailability in a diabetic rat model (Malathi et al., 2015). Thus, a fine tuning of NP physicochemical parameters should be considered to resolve the bioavailability problem. Costantino et al. (2006) suggested the modification of surface properties to improve bioavailability of encapsulated insulin. Indeed, particle size, NP stability, and surface charge may affect NP absorption capacities (Bakhrui et al., 2013). Regarding NP size, many studies showed various internalization mechanism in function of the NP size (Verma and Stellacci, 2010). However, surface charge studies are less frequent and really controverted. Indeed, various approaches exist, including mucocohesion or polymer stabilization.

Mucocohesion is a process by which a coated mucocohesive polymer (Diop et al., 2015; Nafee et al., 2007) allows the interaction between particles and the intestinal mucus layer, thereby improving the uptake and the bioavailability of encapsulated insulin (Shakweh et al., 2004). The effects of these polymers are related to their high positive charge density (Plapied et al., 2010). Shakweh et al. (2004) showed an increase in paracellular transport with permeation enhancers such as chitosan because of their positive charge promoting interactions with the negative charge of intestinal mucus cells. Similarly, Diop et al. (2015) demonstrated the ability of chitosan NPs, positively charged, to cross the intestinal barrier in Caco-2 cells.

The second strategy to improve bioavailability with surface charge modification involves polymer stabilization by using surfactants. Grabowski et al. (2013) proved that PLGA negatively charged NPs formulated with a stabilizer, pluronic® F68, influence the uptake, cytotoxicity, and bioavailability profiles of NPs, improving internalization. Likewise, Yu et al. (2015) demonstrated that PLGA NPs with a negatively charged surface, formulated without any stabilizer provide a good biological efficiency.

The aim of this study was to compare various surface charges of PLGA NPs using various strategies, in a same study to evaluate the impact of this parameter on NP characteristics such as size, stability, uptake *in vitro*, and efficiency *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PLGA 50:50 Resomer® (RG 502H, M_w 14,000) was purchased from

Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). SDS, (M_w 288.000) was purchased from Euromedex (Souffleweyersheim, France). Rapid insulin, Umuline® (100 UI/mL), was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA). Insuman® (400 UI/mL) was generously supplied by Sanofi-Aventis (Paris, France). Polyvinyl alcohol (PVA 18-88, M_w 130,000) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Pluronic® F68 was obtained from BASF Corporation (Mount Olive, NC, USA). CL113 (Chitosan chloride M_w 70,000 to 150,000; DD 75 to 90%) was purchased from Nova Matrix (Sandvika, Norway). Human crystallin insulin, FITC labeled insulin, isopropanol, fetal bovine serum (FBS), trypsin, streptomycin, 96 and 24 wells plates CELLSTAR® (organic Greiner), and ethyl acetate were from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Acetonitrile was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), anhydrous sodium sulfate was from SDS (Peypin, France). The cellular lineage of human adenocarcinoma (Caco-2) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and the lineage RevHF29MTX was supplied by Dr. Thécia Lesuffleur (INSERM U505, Villejuif, France). DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), antibiotics, antimycotic, no essential amino acids glutamine, phosphate buffered saline (PBS), Hank buffered salt solution (HBSS) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.2. NP preparation

NPs were prepared by double emulsion and solvent evaporation method as previously described (Vauthier and Bouchenal, 2009). PLGA and Pluronic® F68 at the weight of 200 mg and 100 mg, respectively, were dissolved separately in 500 μ L of ethyl acetate and mixed after dissolution. A volume of 400 μ L of commercial insulin or crystalline insulin (3.5 μ g/mL) was added. FITC-labeled insulin (3.5 mg/mL) or deionized water was added in the organic phase and then emulsified under a 66 Watt sonication over 15 s in an ice-cold bath. A volume of 2 mL of aqueous phase with surfactant, PVA (2.5% w/v), SDS (0.01% w/v), or deionized water was added to the resulting water-in-oil (w/o) emulsion. The mixture was then sonicated during 10 s. The double emulsion (w/o/w) was transferred into 10 mL of PVA aqueous solution (0.15% w/v) or deionized water and gently stirred overnight. Particles were then coated with chloride chitosan by electrostatic interaction directly after the NP formulation by a simple transfer into 10 mL of a mix water/chitosan at 7 mg/mL (w/v) under gentle stirring. In order to limit NPs loss, no washing step was realized and NPs were lyophilized for a long-term conservation or kept at 4 °C.

2.3. NP characterization

Size distribution of NPs was determined by dynamic light scattering using Horiba NanoZS (Horiba, Japan) at 25 °C. NP characterization included the measurement of three parameters: NP mean size (diameter is calculated from the cumulative function of particles light scattering intensity); surface charge (Zeta potential), and determination of polydispersity index (PDI). The entrapment efficiency was determined (20,000 \times g, 4 °C for 1 h) and insulin quantity was measured by using HPLC based on monography of European pharmacopeia method. The system consisted of two Prostar 210 solvent delivery systems, a Prostar 410 autosampler and a Prostar 330 Photodiode Array (PDA) UV/vis detector (Varian, Les Ulis, France) and Water's Symmetry C18 5 μ m, column (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Eluent A was composed of 0.05 M Na₂SO₄ in water at pH 2.3 and eluent B was a mix of eluent A/Acetonitrile (55:45, v/v). The mobile phase consisted of a mixture of eluent A/eluent B (42:58, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was kept at 40 °C and the detection wavelength was 214 nm. The entrapment efficacy (EE) and insulin loading were calculated using the following equations

$$EE(\%) = \left(\frac{\text{theoretical total amount of insulin-free insulin}}{\text{theoretical total amount of insulin}} \right) \times 100$$

2.4. Scanning electron microscopy

NP samples were air dried and carbon-coated prior to SEM examination at 5 kV (Hitachi S800, Tokyo, Japan).

2.5. Nanoparticle stability test

NP size and zeta potential were measured as described above once a week during three weeks. According to European pharmacopeia, the gastric medium contained 35 mM NaCl and 80 mM HCl at pH 1.2 and the intestinal medium was prepared with 50 mM KH_2PO_4 and 15 mM NaOH adjusted at pH 6.8. The simulated mediums are enzyme free to allow the quantification of insulin. Then, NPs were incubated with medium (v/v) at 37 °C and, at predetermined time points, samples were centrifuged and the amount of free insulin was measured by HPLC as described above. Results are expressed in percentage of insulin release.

2.6. Models and cell culture

Two cell culture models were used: Caco-2 and co-culture (75% Caco-2 + 25% RevHT29MTX) as described by Nollevaux et al. (2006). Cell culture was performed as described by Reix et al. (2012a,b). Briefly, cells were seeded at a density of 73,000 cells/cm² in DMEM containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine. The medium was supplemented with 20% FBS, concentration currently used and recommended for Caco-2 culture cell (Yee, 1997), 1% antibiotic-antimitotic solution, and 1% of non-essential amino acids solution at 10 mM. Cells were grown over 21 days (to acquire enterocyte phenotype) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ before testing and were used from passage 30 to 60.

2.7. Particle toxicity

Toxicity was determined by measuring mitochondrial activity with CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Cells (19200 cells/well) were seeded on 96-well plates and cultured during 21 days for differentiation. Various concentrations of NPs were tested in previous study and 5 mg of PLGA/well was selected for *in vitro* test because first it was not deleterious for the cells and the concentration of insulin contained in 5 mg/ml of PLGA corresponds to 0.5-1UI of insulin per well, which could mimic the local *in vivo* concentration in the intestine.

Then, NPs were incubated with cells for 4 h and cells were washed three times (10 min) with calcium- and magnesium-free HBSS solution. After treatment, 100 μL of culture medium with 20 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) were added. Cells were incubated 1 h at 37 °C, in 5% CO₂ and absorbance was measured at 490 nm in Metertech 960 microplate reader (Metertech Inc., Taipei, Taiwan). The quantity of formazan product is directly proportional to mitochondrial activity, which is related to the number of living cells. Results are expressed in percentage of viable cells compared to the negative control (untreated cells).

2.8. Trans epithelial electric resistance (TEER) measurement

Cells (200,000) were seeded on 0.336 cm² insert and cultured during 21 days. Cells were incubated with NPs and TEER was measured each hour during 4 h. EGTA was used as positive control of gap junction opening reflecting possible cell toxicity. Results are expressed as a percentage of TEER decrease.

2.9. Study of nanoparticle uptake by flow cytometry

To study NP uptake in our 2 cell culture models, flow cytometry was performed as described by Reix et al. (2012a,b). Briefly, cells were cultured in 24-well plates for 21 days to allow differentiation. Cells were then incubated with FITC-insulin loaded NPs (5 mg of PLGA/well) in DMEM without FBS for 4 h. Cells were washed three times (10 min) with calcium- and magnesium-free HBSS solution, detached by trypsinization, centrifuged, and resuspended in HBSS. Samples were analyzed by a flow cytometer BD (Becton Dickinson and Company) LSR II (Franklin Lakes, NJ, USA) in triplicate; 10 000 events were recorded per well. Results are presented as the amount of intracellular fluorescence.

2.10. In vivo validation

All animal experiments were performed in accordance with European Institutes of Health Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, approval AL/60/67/02/13). Male Wistar rats (120–140 g) (Charles River, Wilmington, MA, USA) were placed in standard collective cages. They were kept under 12 h light/12 h dark cycles and were fed with a standard laboratory rodent diet in pellets form (Safe diets, Augy, France). Food and water were available *ad libitum*. Diabetes was induced by an intraperitoneal injection of streptozotocin at the single dose of 100 mg/kg, leading to a state of hyperglycemia in 3 days. Diabetic rats were selected with c-peptide (< 200) and glycemia values (> 5 g/L). They were then orally administered the formulations (gastroresistant vehicle containing +PVA lyophilized NPs at the dose of 100 UI/kg of insulin or SDS NPs at the doses of 100 and 250 UI/kg) by gavage. The negative control group was vehicle with empty NPs. The biofunctionality of particles was assessed by following the glycemia under fasting conditions during 18 h.

2.11. Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using Graph Pad Prism 7 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). *In vitro* data were analyzed by one-way ANOVA with LSD Fisher's post hoc test for parametric data or Kruskal-Wallis for non-parametric analysis. *In vivo* data were analyzed by repeated-measures ANOVA or one-way ANOVA with a LSD Fisher's post hoc test. Results are presented as mean \pm SEM. P values of less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Particle characterization

The mean size of +PVA NPs measured by dynamic light scattering was 188 \pm 2 nm with a neutral ζ -potential -2 ± 1 mV. PVA removal (-PVA NPs) decreased the size of NPs (168 \pm 8 nm) and a negative charge appeared (-22 ± 1 mV). The size of the NPs was maintained (151 \pm 4 nm) after incorporation of SDS-like surfactant with a ζ -potential of -42 ± 2 mV. Coating of the NPs using chitosan had no impact on NP size (162 \pm 4 and 184 \pm 4 nm) for chitosan and SDS-chitosan NPs, respectively, which were positively charged (56 \pm 2 and 40 \pm 1 mV) (Table 1).

Encapsulation efficacy (EE) was near 100% for all the formulations except for chitosan NPs with a significant decrease to 34% (P < 0.05) (Table 1).

SEM analysis of NPs (Fig. 1) indicated a homogenous size and a round shape for +PVA, -PVA, and SDS particles. In contrast, with chitosan, an aggregation was observed with a network conformation and a polydispersity of NP size confirmed with a PDI around 0.3. This phenomenon was not observed with SDS-chitosan NPs, which seemed more stable.

Table 1

Physicochemical characteristics of modified various insulin-loaded PLGA nanoparticles: +PVA NPs, -PVA NPs, SDS NPs, chitosan NPs, and SDS-chitosan NPs. Dynamic light scattering measurement (size, PDI, and ζ -potential) and encapsulation efficacy data are presented as mean \pm SD (n = 3). All data sets were compared to +PVA NPs. The level of significance was set at $^*p < 0.05$ vs. +PVA particles.

	+PVA NPs	-PVA NPs	SDS NPs	Chitosan coated NPs	SDS NPs coated with chitosan
Size (nm)	188 \pm 2	168 \pm 8	151 \pm 4	162 \pm 4	184 \pm 4
PDI	0.16 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.27 \pm 0.01*	0.15 \pm 0.02
ζ -Potential (mV)	-2 \pm 1	-22 \pm 1*	-42 \pm 2*	56 \pm 2*	40 \pm 1*
EE (%)	100 \pm 0	100 \pm 0	86 \pm 6	34 \pm 11*	92 \pm 10

3.2. Nanoparticle stability

All the formulations of insulin loaded NPs were stable (size and charge) at 4 °C during 21 days (Fig. 2A and B), except for a decrease in size of chitosan NPs after 7 days (Fig. 2A). Stability of NPs was then tested in simulated medium (Fig. 3). +PVA NPs released almost all encapsulated insulin in gastric and intestinal simulated medium after 4 h of incubation. For -PVA NPs, we observed a decrease of insulin released to around 60–70% in intestinal medium after 4 h (Fig. 3B). SDS NPs presented a low release of insulin in gastric conditions (30–40% of free insulin) compared to other NPs (Fig. 3A). However, in intestinal conditions, a burst release was observed after only 30 min. For chitosan-coated NPs, around 75% and 50% of insulin was released in gastric and intestinal conditions, respectively, after 4 h. Chitosan incorporation to SDS NPs provoked a delay in insulin release in gastric medium after 30 min compared to chitosan particles alone (25% vs. 60%). In contrast, an increase of insulin released, 100% of insulin release, was observed in intestinal conditions after 4 h (Fig. 3).

3.3. In vitro toxicity

Compared to cells without treatment, no toxicity was observed in the two cell culture models, Caco-2 and Caco-2/HT29MTX co-culture. In fact, addition of NPs to the cell culture during 4 h did not induce a significant decrease in cell viability regardless of the condition tested (Fig. 4A and B) except for a significant decrease of viability of co-cultured cells treated with SDS-chitosan NPs ($P < 0.05$) (Fig. 4A).

No significant change was observed in term of TEER at 5 h after addition of SDS (89 \pm 3, 75 \pm 7%), +PVA (85 \pm 4, 75 \pm 6%) NPs, and -PVA (79 \pm 6, 65 \pm 9%) compared to cells without NPs (88 \pm 3, 81 \pm 11%) in Caco-2 and co-culture models, respectively (Fig. 5A and B). In contrast, for chitosan and SDS-chitosan NPs, respectively, a strong and significant decrease of TEER was observed in Caco-2 (32 \pm 13, 31 \pm 14%, $P < 0.01$) and Caco-2/HT29-MTX (30 \pm 14, 30 \pm 13%, $P < 0.01$) models compared to the negative control. These values obtained with chitosan-coated NPs were comparable to EGTA, indicating the opening of tight junctions (Fig. 5).

3.4. Associated fluorescence of PLGA-nanoparticles

An increase of associated fluorescence of all types of NPs was observed compared to negative control in the 2 cell culture models, but it was only significant for SDS ($P < 0.01$), chitosan ($P < 0.05$), and SDS-

chitosan NPs ($P < 0.05$) (Fig. 6). Then, all associated fluorescence results of NPs was compared to standard NPs (+PVA NPs). In Caco-2 cells, the highest associated fluorescence of NPs was observed in cells incubated with NPs containing SDS ($P < 0.05$) (Fig. 6). Contrary to the other types of particles in Caco-2 cells, SDS NPs (1787 \pm 407, $P < 0.05$) showed a significant increase of fluorescence compared to +PVA (1277 \pm 225). Likewise, in co-culture, SDS NPs showed an increase of associated fluorescence compared to negative control ($P < 0.05$) (Fig. 6). Chitosan-SDS NPs uptake (2821 \pm 1229) seems to increase, but with a very high standard deviation. Moreover, no statistical difference was observed with these NPs. For -PVA NPs, in the 2 cell culture models, no significant increase of fluorescence was observed compared to +PVA NPs (Fig. 6). Similarly, in the co-culture model, no significant increase of fluorescence was observed for all types of NPs compared to +PVA NPs, except for a trend towards statistical significance for SDS NPs ($P = 0.08$).

3.5. In vivo validation using a diabetic rat model

For all conditions, a decrease of glycaemia was observed from 4 h to 18 h (Fig. 7). Oral administration of the complex vector (SDS NPs with gastroresistant vehicle) induced a significant decrease in blood glucose levels in diabetic rats as compared to +PVA NPs at 12 h. Compared to free insulin, this decrease was concentration dependent with a higher decrease with a concentration of 250 UI/kg at 12 h ($P < 0.005$) than with a concentration of 100 UI/kg at 16 h ($P < 0.01$). Gastro-resistant vehicle containing empty NPs had no effect on fasting glycemia in diabetic rat during the follow up compared to free insulin (Fig. 7).

4. Discussion

Our study shows that modifying the NP surface charge could increase the bioavailability of insulin. We demonstrated that negative surface charge impact on NP uptake via the intestinal membrane compared to uncharged NPs and mostly positively charged NPs.

We investigated the role of surface charge using several formulations of PLGA NPs, including NPs stabilized with a surfactant, PVA, which presents a neutral surface charge (Reix et al., 2012a,b) and is considered a reference NP, NPs formulated without PVA with a low negative surface charge, NPs formulated with SDS with a high negative charge, and NPs positively charged covered with or without surfactant. In summary, the physicochemical characteristics of all types of PLGA loaded NPs were stable during 21 days with a mean diameter around

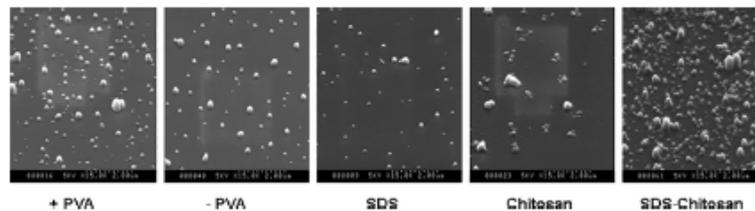


Fig. 1. SEM images of various insulin loaded PLGA nanoparticles: +PVA NPs, -PVA NPs, SDS NPs, chitosan NPs, and SDS-chitosan NPs. Scale bars = 2 μ m.

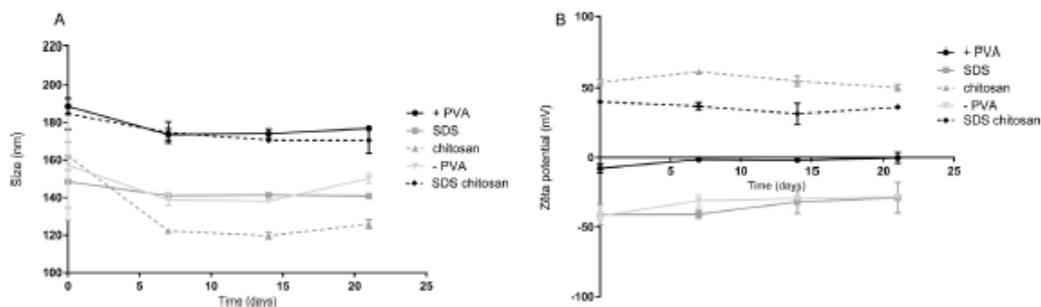


Fig. 2. Stability of various insulin loaded PLGA nanoparticles: +PVA NPs, -PVA NPs, SDS NPs, chitosan NPs and SDS-chitosan NPs. The physicochemical parameters: size (A) and ζ -potential (B) were evaluated over time. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3).

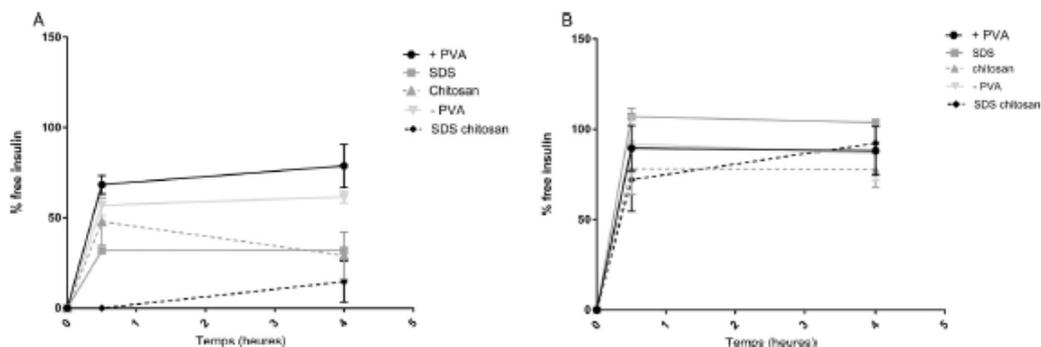


Fig. 3. Stability of various insulin loaded PLGA nanoparticles: +PVA NPs, -PVA NPs, SDS NPs, chitosan NPs and SDS-chitosan NPs in gastric (A) (pH = 1.2) and intestinal medium (B) (pH = 7.4) for 4 h. All the experiments were performed at 37 °C. Released insulin was quantified by HPLC using the European pharmacopela monography. Data are presented as mean \pm SEM (n > 3).

200 nm for all types of NPs, but different surface charges, which correlated with the NP uptake results obtained in 2 *in vitro* cell culture models.

4.1. Impact of formulation on NP charge

Positively charged NPs were obtained by using a coating method, (13) allowing a mucoadhesive polymer, chitosan, to be positioned around NPs via an electrostatic interaction between the amine group (NH_3^+) and carboxylic group (COO^-) of PLGA (Zhou et al., 2010). However, chitosan NPs seemed to be unstable. A study reported that this electrostatic interaction could induce swelling or shrinking of NPs (Lopes et al., 2016), which could explain the instability of NPs in term of size. "In fact, chemical properties of chitosan play a major role in this instability because chitosan is a stable polymer, which is positively charged only at low pH (pH < 5.5) (Szymanska and Winnicka, 2015). Consequently, it is unstable in our experimental conditions that are close to pH = 7, confirmed by an aggregation of NPs with a high PDI and a low encapsulation efficiency. Moreover, we could observe that if there is not a strong interaction between the nanoparticles and the chitosan, the NPs were instable and the efficiency of encapsulation were low. In contrast, when a strong interaction was performed between negatively charged NPs and chitosan, (SDS-NPs), the system is more stable and the efficiency of encapsulation increased.

At the opposite, chitosan NPs were stable in gastric medium (pH = 1.2), where it could prevent the release of insulin because of a stable system with electrostatic interactions between positively charged chitosan and hydrolyzed and negatively charged PLGA (Lopes et al.,

2016).

In contrast, negatively charged NPs were formulated without PVA or with negatively charged surfactant (SDS). In absence of stabilizing agent (-PVA NPs), NPs were safer and respected pharmaceutical requirements, which limit the use of surfactant (Sekhon, 2013). The negative charge is provided by PLGA hydrolysis in aqueous medium (Gentile et al., 2014); lactic acid and glycolic acid are metabolized by the Krebs cycle (Danhier et al., 2012), which renders the system biocompatible. In term of stability, surprisingly, the absence of surfactant does not affect physicochemical characteristics of NPs (low size and PDI). An hypothesis could be that pluronic® F68 with good surfactant properties (Santander-Ortega et al., 2009) in suspension and present in excess in the first emulsion allows the stabilization of the second emulsion. This explanation was confirmed when we formulated insulin NPs with a higher concentration of insulin (Insuman® 400 UI/mL, data not shown) where aggregation was observed only for NPs without PVA, indicating that the concentration of Pluronic® F68 was insufficient to stabilize insulin in high concentration. This phenomenon could also be attributed to the electrostatic interaction between insulin and PLGA, which could induce insulin aggregation (Danhier et al., 2012). Nevertheless, the negative charge of NPs formulated without PVA could be higher. Indeed, Danhier et al. (2012) demonstrated that electrostatic interactions exist between positive charges of insulin (pH < 5.5) and negative charges of hydrolyzed PLGA (Danhier et al., 2012), which could partially mask negative charges. Therefore, to test the effect of a high negative charge, we used SDS, a negatively charged surfactant commonly used in the pharmaceutical industry (Anderberg et al., 1992). It was adsorbed to the NP surface via a negatively charged

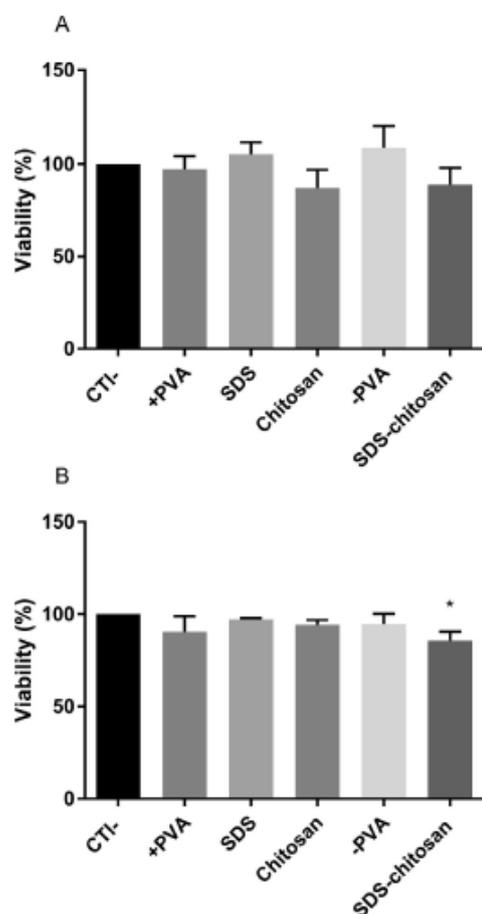


Fig. 4. Cell viability. Cell viability was measured by using the MTS assay; 5 different types of NPs, +PVA NPs, -PVA NPs, SDS NPs, chitosan NPs, and SDS-chitosan NPs, were evaluated by using 2 cell culture models, Caco-2 cells (A) and Caco-2/RevHT29 MTX co-culture model (B). Cells without incubation were used as negative control and set as 100% of viability. Data are presented as mean \pm SEM ($n > 3$). All datasets were compared to the negative control. The level of significance was set at $p < 0.05$ vs. negative control.

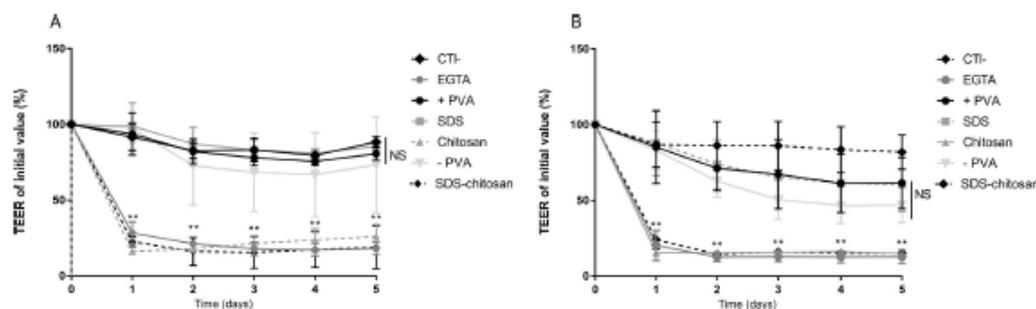


Fig. 5. The percentage of transepithelial electric resistance (TEER) of the cell monolayer compared to the initial level. TEER was measured with an ohmmeter; 5 types of NPs were evaluated on 2 cell culture models, Caco-2 cells (A) and Caco-2/RevHT29 MTX co-culture model (B). EGTA was used as a positive control of gap junction opening. Data are presented as mean \pm SEM ($n > 3$). All datasets were compared to the negative control. The level of significance was set at $p < 0.01$ vs. negative control.

hydrophilic head, permitting the stabilization of the system (Gao and Chorover, 2010). Additionally, SDS was used to stabilize chitosan NPs. The idea was to create electrostatic interactions between chitosan (+) and SDS (-) to obtain a stable NPs system positively charged. This system showed stability in terms of size distribution and insulin quantity inside the system compared to the classic chitosan NPs.

4.2. Impact of formulation on biological systems

To study the impact of the charge of the designed NP systems on insulin bioavailability, we assessed *in vitro* uptake in 2 cell culture models. The first model was composed of Caco-2 cells, enterocytes involved in the formation of a brush border and expressing typical metabolic enzymes and efflux transporters. The second model was a co-culture of Caco-2 and HT29 MTX cells, which are goblet cells producing mucus that covers the epithelium and protects it (Schimpel et al., 2014), to mimic the intestinal epithelium model.

In this context, a significant higher uptake was observed with negatively charged NPs. To explain this result, toxicity and internalization mechanism should be discussed for each type of NPs. For negatively charged NPs, Qian et al. showed that surfactants like SDS induce an opening of cell junctions through their detergent properties (Yu Qian, 2013). However, in our study, TEER results showed no effect of SDS NPs on these cell junctions and proved that SDS NPs do not induce a long-term toxicity and do not use a paracellular mechanism to cross the intestinal barrier. However, a higher negative charge could have an effect on NPs uptake through a transcellular mechanism to cross the intestinal barrier via the endocytic pathway (Grabowski, 2013) and more precisely using caveolin dependent pathway to cross intestinal barrier (Bannunah et al., 2014). However, for -PVA NPs, an effect on tight junction was observed on both *in vitro* models, which could be explained by the aggregation of NPs during evaporation or an effect of negative charges which could bind to Ca^{2+} , presents to maintain tight junction integrity (Sajeesh et al., 2010) and induce toxicity and a possible paracellular mechanism.

In the same way, positively charged NPs like chitosan or SDS-chitosan NPs didn't show toxicity in terms of viability but a real impact on tight junction was observed with a huge decrease of TEER compared to negatively charged NPs (-PVA NPs). Indeed, it is known that mucocohesive NPs like chitosan NPs use a paracellular mechanism due to the presence of chitosan which have an effect on protein of tight junction through translocation mechanism from the membrane to cytoskeleton (38) and lead an opening which could provoke a long-term toxicity for an oral insulin administration which is a multiple daily treatment.

However, mechanism to cross intestinal barrier is not the only one explanation of a higher uptake of negatively charged NPs. Indeed,

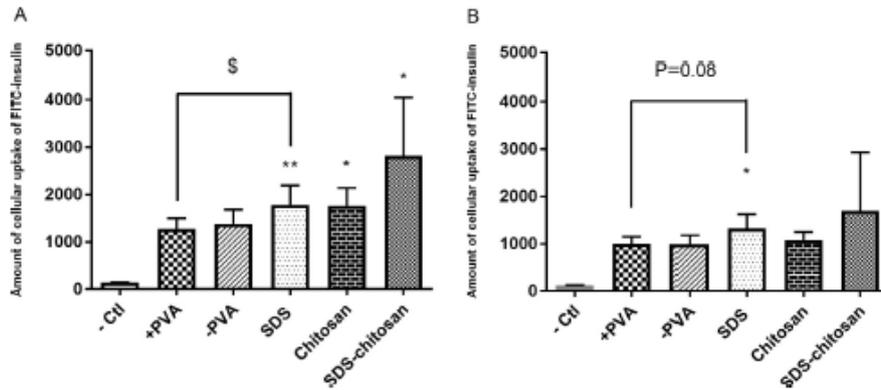


Fig. 6. Uptake of insulin loaded PLGA particles in Caco-2 cells. Associated fluorescence measurements were performed by flow cytometry; 10 000 events were recorded per well and data are expressed as the mean fluorescence intensity. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 6$). All datasets were compared to the negative control and +PVA NPs. The level of significance was set at $p < 0.05$ vs. negative control, $^{*}p < 0.01$ vs. negative control, and $^{\$}p < 0.05$ vs. +PVA particles.

mucoadhesive properties of chitosan could play a major role. In this way, some studies showed that the fluorescence signal of positively charged NPs could also be attributed to adhesion of the NP surface with intestinal mucus at the cell surface rather than to internalization. In fact, positive charge with mucoadhesive properties increase the contact time between the intestinal layer covered with mucus and NPs (Lopes et al., 2014), allowing an electrostatic interaction between positive charges and the negatively charged cell membrane due to the presence of the proteoglycan, heparin sulfate, on the cell surface (Boddupalli et al., 2010). This electrostatic interaction could be too strong and could prevent NP internalization (Sheng et al., 2015). This theory could be checked thanks to use of a molecule to quench external fluorescence like trypan blue (Loike and Silverstein, 1983) and attributed the fluorescence signal to a real internalization (Supplemental data S1).

Moreover, these strong interactions could reduce direct contact of NPs with the epithelium contrary to SDS NPs which are not coated and more accessible for mucus and create more interaction with epithelium (Sajeesh et al., 2010).

The uptake results obtained in the Caco-2 cell culture model were not reproducible in the Caco-2/HF29MTX co-culture model indicating the importance of the cell culture model. Schimpel et al. (2014) showed that the transport of particles increased (50-fold) in M cells compared to pure Caco-2 cells. The uptake difference observed between SDS-NPs and other NPs could be confirmed by using an *in vitro* triple culture

model including lymphocytes (Antunes et al., 2013) or with an *ex-vivo* system using Ussing chambers (Lundquist and Artursson, 2016).

Based on this increased uptake with highly negatively charged NPs, insulin loaded SDS-NPs were orally administered to hyperglycemic rats to validate our NP system. For positive control, subcutaneous insulin was used and stopped after 4 h to prevent on severe hypoglycemia due to fasting condition. For oral insulin conditions, the hypoglycemic effect was dose-dependent with a first effect at 100 UI/kg and an increase at 250 UI/kg. The effect was first observed after 12 h and was still significant at 18 h. This delay and long-term effect is confirmed with intraduodenal injection of C-peptide NPs (Supplemental data S2). The profile obtained is that of a long-acting insulin but with an absorption wave of insulin bound to the passage of the intestinal barrier. The aim of C-peptide encapsulation was to determine bioavailability in encapsulated system. Indeed, it was impossible to dose insulin in rat blood because of hemolysis of blood sample due to sampling by the rat's tail (Auberval et al., 2014). Moreover, insulin dosage doesn't reflect the total quantity absorbed in intestinal level due to first hepatic pass effect, a higher stability of C-peptide in blood and a low hepatic extraction (Polonsky et al., 1983). This bioavailability showed around 10% with +PVA NPs, which justify the use of 20 or 50 UI/rat compare to 2 at 5 UI/rat in subcutaneous injections. Moreover, the low bioavailability could be explained with a burst release of insulin in intestinal conditions. This delay observed to obtain a hypoglycemic effect of insulin

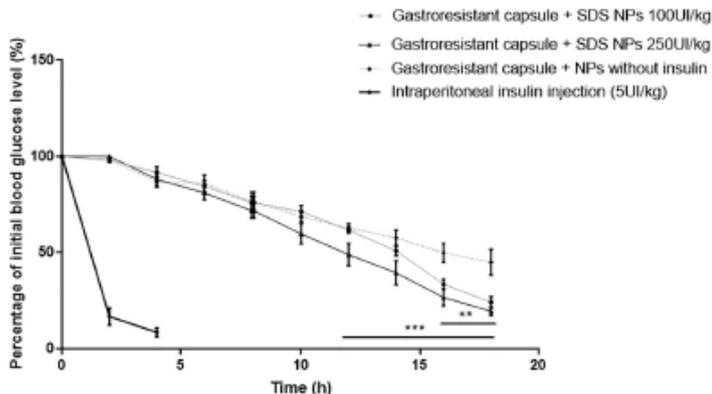


Fig. 7. Blood glucose levels in diabetic rats after oral administration of insulin loaded PLGA NPs: + PVA particles and SDS particles at an insulin dose of 100 or 250 UI/kg ($n \geq 6$) and intraperitoneal insulin (5UI/kg) ($n = 3$), NPs without insulin served as a blank control. All datasets were compared to NPs without insulin. The level of significance was set at $^{***}p < 0.005$ vs. NPs without insulin and $^{**}p < 0.01$ vs NPs without insulin.

NPs could be explained two ways: first, insulin NPs take longer to reach the specific region of the intestines favorable for insulin absorption. In fact, it was reported that the jejunum and ileum have an apparent 2- to 15-fold higher permeability than other segments of the intestinal tract, where abundant Peyer's Patches exist (Agarwal et al., 2001). Moreover, the passage of NPs through the intestinal barrier could also delay the hypoglycemic effect. Reix et al. (2012a,b) demonstrated that NPs are still present in Caco-2 cells 4 h after their absorption and co-localized with lateral cell membranes. Moreover, we proved that differences based on mucoadhesive properties link to charge of NPs exist *in vitro*. Likewise, Iwanaga et al. showed that the hypoglycemic effect of liposomes was prolonged after modification of their surface by poly(ethylene oxide) (PEO). In fact, PEO present a high affinity to the mucous layer of the small intestine, which is present in pluronic® F68, the surfactant used in our formulation. These data could also explain the long acting effect of insulin related to the NP system, (Agarwal et al., 2001), like a delayed insulin model.

5. Conclusion

This study demonstrated the real impact of physicochemical parameters like surface charge of NPs on *in vitro* uptake and bioavailability of insulin. Results showed in same study that formulating negatively charged particles are simplest to stabilize contrary to mucoadhesive NPs, formulated with chitosan and positively charged. Moreover, negatively charged particles are not toxic, more efficient *in vitro* and showed efficiency *in vivo* on diabetic rat model compared to positively charged NPs. This formulation is a promising approach for oral insulin delivery.

Conflict of interest

None

Acknowledgment

The authors would like to thank Sanofi for supplying insulin. In addition, thank to Dr Demais Valérie for their help in microscopy studies. **Funding sources**

This work was funded by region Alsace (Grand-Est, grant number 438/13/CI), BPI France (Banque publique d'investissement, grant number A1010014A), FEDER (fonds européen de développement regional, grant number 32351), Strasbourg Eurométropole, and Alsace BioValley.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.045>.

References

- Agarwal, V., Nazzari, S., Reddy, L.K., et al., 2001. Transport studies of insulin across rat jejunum in the presence of chicken and duck ovomucoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1131–1138.
- Anderberg, E.K., Nyström, C., Artursson, P., 1992. Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on trans-epithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* 81, 879–887.
- Antunes, F., Andrade, F., Araújo, F., et al., 2013. Establishment of a triple co-culture *in vitro* cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 427–435.
- Auberval, N., Dal, S., Biediger, W., et al., 2014. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high fat diet. *Diab. Metab. Syndr.* 6, 130.
- Aungst, R.J., 2000. Intestinal permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.* 89, 429–442.
- Bakuru, S.H., Furtado, S., Morello, A.P., et al., 2013. Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 811–821.
- Bannan, A.M., Vilasalu, D., Lor, J., et al., 2014. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol. Pharm.* 11, 4363–4373.
- Boating, J.S., Mitchell, J.C., Posen, H., et al., 2014. Functional characterization and permeation studies of lyophilized thiolated chitosan xerogels for buccal delivery of insulin. *Protein Pept. Lett.* 21, 1163–1175.
- Boddu palli, B.M., Mohammed, Z.N., Nath, R.A., et al., 2010. Mucoadhesive drug delivery system: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1, 381–387.
- Costantino, L., Gandolfi, F., Bossy-Nobs, L., et al., 2006. Nanoparticulate drug carriers based on hybrid poly(D, L-lactide-co-glycolide)-dendron structures. *Biomaterials* 27, 4635–4645.
- Cui, F.D., Tao, A.J., Gan, D.M., et al., 2007. Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J. Pharm. Sci.* 96, 421–427.
- Dal, S., Jeandrier, N., Schachkow, A., et al., 2015. Portal or subcutaneous insulin infusion: efficacy and impact on liver inflammation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 29, 488–498.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., et al., 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161, 505–522.
- Diop, M., Auberval, N., Viglino, A., et al., 2015. Design, characterization, and bioefficiency of insulin-chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking. *Int. J. Pharm.* 491, 402–408.
- Foss, A.C., Peppas, N.A., 2004. Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with Caco-2 cultures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 447–455.
- Gao, X., Chorover, J., 2010. Adsorption of sodium dodecyl sulfate (SDS) at ZnSe and alpha-Fe2O3 surfaces: combining infrared spectroscopy and batch uptake studies. *J. Colloid Interface Sci.* 348, 167–176.
- Gentile, P., Chiono, V., Garmagnola, L., et al., 2014. An overview of poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 3640–3659.
- Grabowski, N., Hillarou, H., Vergnaud, J., et al., 2013. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. *Int. J. Pharm.* 454, 686–694.
- Hardy, J.G., Hanley, J.N., Reynolds, J.R., 1987. Evaluation of an enteric-coated delayed-release 5-aminosalicylic acid tablet in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1, 273–280.
- Krishnamachari, V., Madan, P., Liu, S., 2007. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. *Int. J. Pharm.* 338, 238–247.
- Li, M.G., Lu, W.L., Wang, J.C., et al., 2006. Preparation and characterization of insulin nanoparticles employing chitosan and poly(in ethylmethacrylate/methylmethacrylic acid) copolymer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 2874–2886.
- Loike, J.D., Silverstein, S.C., 1983. A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages. *J. Immunol. Meth.* 57, 373–379.
- Lopes, M., Shrestha, N., Correia, A., et al., 2016. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin. *J. Control. Release* 232, 29–41.
- Lopes, M.A., Abraham, R.A., Seica, R., et al., 2014. Intestinal uptake of insulin nanoparticles: facts or myths? *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15, 629–638.
- Lundquist, P., Artursson, P., 2016. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: opportunities, limitations and studies in human tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106, 256–276.
- Malathi, S., Nandhakumar, P., Pandiyan, V., et al., 2015. Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. *Int. J. Nanomed.* 10, 2207–2218.
- Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., et al., 2007. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine* 3, 173–183.
- Naibo, Y., M.A.B., Haris, P., Wen, J., et al., 2014. Enhancing the oral bioavailability of peptide drugs by using chemical modification and other approaches. *Med. Chem.* 4 (12), 763–769.
- Nazar, H., Tsihoukts, J., 2012. Towards the nasal delivery of insulin. *Theor. Deliv.* 3, 1241–1243.
- Nolleaux, G., Deville, C., El Moulil, B., et al., 2006. Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-SM21). *BMC Cell Biol.* 7, 20.
- Plato-Alphandary, H., Aboubakar, M., Jallard, D., et al., 2003. Visualization of insulin-loaded nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* studies after oral administration to rats. *Pharm. Res.* 20, 1071–1084.
- Plapied, L., Vandermolen, G., Vroman, R., et al., 2010. Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery. *Int. J. Pharm.* 398, 210–218.
- Polonsky, K., Jaspán, J., Emmanuel, D., et al., 1983. Differences in the hepatic and renal extraction of insulin and glucagon in the dog: evidence for saturability of insulin metabolism. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 102, 420–427.
- Poncet, D.R.V., Dulieu, C., Pior, A., 1998. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Colloids Surf.* 171–176.
- Reix, N., Guhmann, P., Biediger, W., et al., 2012a. Duodenum-specific drug delivery: *in vivo* assessment of a pharmaceutically developed enteric-coated capsule for a broad applicability in rat studies. *Int. J. Pharm.* 422, 338–340.
- Reix, N., Parat, A., Seyfritz, E., et al., 2012b. *In vitro* uptake evaluation in Caco-2 cells and *in vivo* results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 437, 213–220.
- Sajeesh, S., Bouchemal, K., Sharma, C.P., et al., 2010. Surface-functionalized poly-methacrylic acid based hydrogel microparticles for oral drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 209–218.
- Santander-Ortega, M.J., Bastes-Gonzalez, D., Ortega-Vinuesa, J.I., et al., 2009. Insulin-

- loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 45–53.
- Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., et al., 2007. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm. Res.* 24, 2198–2206.
- Schimpel, C., Teubl, B., Absenger, M., et al., 2014. Development of an advanced intestinal in vitro triple culture permeability model to study transport of nanoparticles. *Mol. Pharm.* 11, 808–818.
- Sekhon, B.S., 2013. Surfactants: pharmaceutical and medicinal aspects. *J. Pharm. Technol. Res. Manage.* 1, 43–68.
- Shakweh, M., Ponchel, G., Fattal, E., 2004. Particle uptake by Peyer's patches: a pathway for drug and vaccine delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1, 141–163.
- Sheng, J., Han, L., Qin, J., et al., 2015. N-trimethyl chitosan chloride-coated PLGA nanoparticles overcoming multiple barriers to oral insulin absorption. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 15430–15441.
- Szymanska, E., Winnicka, K., 2015. Stability of chitosan—a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar. Drugs* 13, 1819–1846.
- Vauthier, C., Bouchemal, K., 2009. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm. Res.* 26, 1025–1058.
- Verma, A., Stellacci, F., 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6, 12–21.
- Wu, Z.M., Ling, L., Zhou, L.Y., et al., 2012. Novel preparation of PLGA/HP55 nanoparticles for oral insulin delivery. *Nanoscale Res. Lett.* 7, 299.
- Xuan, B., McClellan, D.A., Moom, R., et al., 2005. Alternative delivery of insulin via eye drops. *Diabetes Technol. Ther.* 7, 695–698.
- Yee, S., 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm. Res.* 14, 763–766.
- Yu, F., Li, Y., Liu, C.S., et al., 2015. Enteric-coated capsules filled with mono-disperse micro-particles containing PLGA-lipid-PEG nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 484, 181–191.
- Yu Qian, L.J.Z., Zhi Min, Wu, Zhou, Li Ying, Jiang, Wei, Ling, Li, Luo, Qian, Guo, Xin Dong, 2013. Enteric-coated capsule containing cationic nanoparticles for oral insulin delivery.
- Zhou, H.N., Li, Y.M., Liu, T., 2010. Current status and perspective of research on PEG-PLGA. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 32, 561–563.

**Validation of a major modification of the mobile phase in
the European Pharmacopoeia LC-UV human insulin assay**

Journal:	<i>Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	CZUBA, Elodie; Centre Européen d'Etude du Diabète, UMR DIATHEC, EA 7294 JULIEN-DAVID, Diane; Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, CAMBAP ENGEL, Thomas; Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, CAMBAP PINGET, Michel; Centre Européen d'Etude du Diabète, UMR DIATHEC, EA 7294 SIGRIST, Séverine; Centre Européen d'Etude du Diabète, UMR DIATHEC, EA 7294 MARCHIONI, Eric; Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, CAMBAP BERGAENTZLE, Martine; Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, CAMBAP
Keywords:	European Pharmacopoeia, method validation, insulin, HPLC-DAD < HPLC

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

To prevent the buildup of salt crystals inside the chromatograph tubing and pump that occurs with the high mobile phase sodium sulfate concentration (148 mM) used in the European Pharmacopoeia method for the quantification of human insulin, the use of a lower concentration was proposed. A minimal concentration of 37 mM sodium sulfate maintained the chromatographic performance while avoiding instrumental damage. This buffer concentration modification is considered as a major change by the European Pharmacopoeia and this improved method therefore had to be validated.

Using a single-point calibration (600 µg/mL) yielded adequate precision (the highest relative standard deviations for repeatability and intermediate precision were <5 % and <8 %, respectively) and trueness (bias values between -8 % and +7 %) for the quantification of human insulin in solutions of known concentration and in commercial insulin preparations. The limits of detection and quantification (1.6 and 4.5 µg.mL⁻¹, respectively) were largely sufficient for the purpose of the method.

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. Introduction

According to the World Health Organization, 422 million people worldwide had diabetes in 2014, with 5–10 % of those people having type 1 diabetes [1], which undergoes treatment with insulin by the injection route, provoking a serious problem with treatment adherence. Many ongoing studies aim to improve the life of patients with diabetes through approaches such as pancreatic islets transplantation [2], the modulation of oxidative stress [3], or developing a new route for insulin administration. To overcome this last challenge, various routes of administration have been studied but the oral route is the best candidate for mimicking physiological insulin secretion owing to the first hepatic pass [4]. However, insulin presents a low bioavailability by the oral route. To improve the bioavailability, encapsulation systems have been developed and their physico-chemical characteristics have been studied (such as their size, surface charge, and encapsulation efficacy). Indeed, the determination of insulin content in encapsulation systems is essential [5].

Insulin is a hormone that is secreted by beta cells of the islets of Langerhans in the pancreas and regulates glucose homeostasis. Its structure is composed of 51 amino acids in an α chain with 21 residues and a β chain with 30 residues, with two disulfide bridges linking these two chains [6]. For insulin quantification, various methods exist such as the enzyme-linked immunosorbent assay [7], ultraviolet (UV) absorbance [8], and UV- or mass spectrometry-coupled liquid chromatography [9]. The European Pharmacopoeia monography proposes an isocratic liquid chromatographic method with separation on a C18 column and UV detection [10]. To expose the hydrophobic parts of insulin and thus permit a better retention on the C18 column, allowing an increased retention time, a high concentration of sodium sulfate is employed in the mobile phase. However, this high salt concentration generates technical problems such as causing damage to the chromatograph pump and column.

2

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/ljlc> Email: nelugrinberg50@gmail.com

1
2
3
4 To solve this problem, it was proposed to reduce the salt buffer concentration in the mobile
5 phase while maintaining the chromatographic performance of this method to accurately
6 quantify insulin. As stated by the European Pharmacopoeia [11], a change of more than 10 %
7 in the buffer salt composition requires further method validation. This method validation
8 should be realized according to the guidelines for the validation of analytical procedures
9 outlined in the International Conference on Harmonization ICHQ2R [12], which require the
10 evaluation of selectivity, linearity, trueness, and precision.
11

12
13 The selectivity and sensitivity of the validated method were verified in the context of insulin
14 quantification in nanoparticle systems formulated with commercial insulin preparations
15 (Umuline[®] and Insuman[®]).
16
17

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 **2. Materials and methods**

29 30 31 **2.1. Chemicals and reagents**

32
33 Various types of insulin were used. The fast-acting insulin Umuline[®] (100 IU/mL) was
34 purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA), Insuman[®] (400 IU/mL) was generously
35 supplied by Sanofi-Aventis (Paris, France), and human crystalline insulin and porcine insulin
36 were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
37
38

39 Acetonitrile was of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and was
40 purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Anhydrous sodium sulfate was obtained
41 from SDS (Peypin, France) and phosphoric acid was purchased from Riedel-de-Haen (Seelze,
42 Germany).
43

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

2.2. Preparation of solutions

Human insulin was prepared at $3.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and porcine insulin at $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at pH 7.2 and stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. From this solution, various concentrations of crystalline insulin were prepared in 0.01 M HCl at 16, 50, 100, 300, and $600 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the calibration curves and at 30, 80, and $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the determinations of trueness and precision.

The commercial human insulins Umuline[®] and Insuman[®] were labeled as containing $120 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $480 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ insulin, respectively, and both solutions were analyzed without any special preparation.

2.3. Quantification of insulin by HPLC with diode array detection (HPLC-DAD)

To quantify insulin, analysis was performed by HPLC-DAD using a Varian HPLC system with a ProStar[®] pump coupled to a ProStar[®] 330 DAD and a ProStar[®] 410 autosampler with an injection volume of $20 \text{ }\mu\text{L}$ (Varian, Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was achieved at $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ on a Waters C18 Symmetry[®] column ($5 \text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, 300 \AA) (Waters, Milford, MA, USA). According to the European Pharmacopoeia [10] the reference mobile phase consisted of a 42:58 mixture (A:B) of a phase A (200 mM sodium sulfate aqueous solution adjusted to pH 2.3 with phosphoric acid) and a phase B (55:45 mixture of phase A:acetonitrile). Under these conditions, the final mobile phase sodium sulfate concentration was 148 mM . Various sodium sulfate concentrations were tested for phase A (30, 50, or 100 mM) resulting in final mobile phase sodium sulfate concentrations of 22, 37, or 74 mM , respectively. The elution was performed isocratically at a flow rate of $1 \text{ mL}/\text{min}$. The detection wavelength was 214 nm . Data acquisition and integration were executed with the software StarChromatography Workstation Ver6.41 (Varian). Unknown contents of insulin samples were calculated in relation to the surface of the chromatographic peak using the external calibration method.

2.4. Method validation

The method was validated in terms of selectivity, sensitivity, linearity, precision, and trueness according to the ICH guidelines [12].

The reference and optimized chromatographic conditions (with sodium sulfate concentrations of 148 mM and 37 mM, respectively) were compared during the complete validation process. All samples were analyzed on three different days and in triplicate on each day.

2.4.1. Selectivity

The selectivity of the method was evaluated according to the European Pharmacopoeia guidelines [10] with the injection of 20 μL of a solution containing a mix of porcine and human insulin at 2 mg mL^{-1} , and by measuring the resolution (R_s) obtained between the resulting two peaks, the minimal resolution was set at 1.2. Moreover, the peak asymmetry factor (A_s) of human insulin was determined according to the following equation:

$$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

where $w_{0.05}$ is the width of the peak at one-twentieth of the peak height and d is the distance between the perpendiculars dropped from the peak maximum and the leading edge of the peak at one-twentieth of the peak height. An A_s value of 1 signifies symmetry. When $A_s > 1$, the peak is tailing. When $A_s < 1$, the peak is fronting [11].

Furthermore, the selectivity was evaluated in terms of peak purity by comparing the upslope, apex, and downslope UV spectra obtained with the DAD detector.

2.4.2. Sensitivity and linearity

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained by injecting successively diluted standard solutions in 0.01 M HCl. The determinations of LOD and LOQ were based on the criteria of signal-to-noise ratios of 3 for the LOD and 10 for the LOQ. The

1
2
3 trueness and precision were checked at the LOQ by the analysis of 10 samples prepared at
4
5 concentrations near the quantitation limit.
6

7
8 Five standard solutions containing human insulin (16, 50, 100, 300, and 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were
9
10 used for calibration curves. These curves were evaluated on the basis of peak area (nA.s)
11
12 vs. concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Three different linear fits were tested daily: " $ax + b$ " (linear least
13
14 squares fitting calculated with five solutions injected in triplicate), " $ax + 0$ " (linear least
15
16 squares fitting forced through the origin calculated with five solutions injected in triplicate),
17
18 and " ax " (simple proportionality using the mean peak area from the triplicate analysis of the
19
20 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution).
21
22

23
24 To confirm the linearity of the calibration function, the "lack-of-fit" test suggested by Araujo
25
26 *et al.*, 2012 [13] was used. This test compares, by means of a Fisher's test, the variance due to
27
28 the lack-of-fit to the variance due to pure experimental error. If the calculated p -value is lower
29
30 than 0.05, then the linearity of the response function is deemed to be insufficient.
31
32

33 2.4.3. Precision

34
35 The precision of the method was evaluated by quantifying human insulin in three self-
36
37 prepared solutions (at 30, 80, and 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and two commercial insulin preparations on
38
39 three different days to assess the repeatability (intraday precision with three repetitions each
40
41 day) and intermediate precision (day-to-day precision). Each day, quantification was
42
43 performed using the three daily calibration curves, i.e., $ax + b$, $ax + 0$, and ax . Statistical data,
44
45 such as the overall mean concentration from the analyses on the 3 days, the repeatability
46
47 (intraday), and the intermediate (day-to-day) precision for each calibration were calculated
48
49 using a one-way (day of quantification) analysis of variance.
50
51
52

53 2.4.4. Trueness

1
2
3 The trueness of the method was evaluated using the same samples and conditions as were
4 used for evaluating the precision. For each sample, the bias was determined in percentage
5 according to the formula:
6
7

$$\text{Bias (\%)} = \frac{\text{mean calculated concentration} - \text{reference concentration}}{\text{reference concentration}} \times 100,$$

8
9
10
11
12
13
14 where the *mean calculated concentration* is the overall mean concentration from the analyses
15 on the 3 days for a given sample and a given calibration curve, while the *reference*
16 *concentration* is either the expected concentration (self-prepared solutions or the labeled
17 concentration of the commercial sample) or the overall mean concentration of the 3 days
18 obtained with the reference European Pharmacopoeia Method (for the same sample and
19 calibration curve). The latter case allows comparison between the methods.
20
21
22
23
24
25
26

27 2.5. Method application

28
29 A nanoparticle (NP) encapsulation system was formulated as described by Czuba *et al.*, 2018
30 [14] and two types of NPs were studied in terms of their entrapment efficiency and stability in
31 intestinal simulated medium, namely, sodium dodecyl sulfate (SDS) and SDS-chitosan
32 nanoparticles.
33
34
35
36
37

38 The entrapment efficiency (EE) was determined by an indirect method. To that end, the NPs
39 were centrifuged (20 000 × g, 4 °C for 1 h), free insulin was quantified in the supernatant, and
40 the EE was calculated using the following equation:
41
42
43
44

$$\text{EE(\%)} = \frac{\text{theoretical total amount of insulin} - \text{free insulin}}{\text{theoretical total amount of insulin}} \times 100$$

45
46
47
48
49 For NP stability studies, NPs were incubated with medium (v/v) at 37 °C, samples were
50 centrifuged, and the amount of free insulin was measured. The results are expressed as the
51 percentage of insulin release.
52
53
54
55
56
57

7

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/ljlc> Email: nelugrinberg50@gmail.com

3. Results and discussion

3.1. Mobile phase sodium sulfate concentration modification

High sodium sulfate concentrations are often used in reversed phase protein separation, since they force proteins to expose their hydrophobic domain to the surrounding environment, consequently facilitating their retention on reversed phase material. However, these high sodium sulfate concentrations result in salt crystals building up inside the chromatograph tubing and pump. To prevent this problem and simultaneously propose a suitable method for insulin determination, the effect of using lower Na_2SO_4 concentrations on the resolution between human and porcine insulin was evaluated (Table 1). According to the European Pharmacopoeia monography to quantify human insulin, the resolution should be at least 1.2 [10]. At Na_2SO_4 concentrations of 37 mM or higher the resolution factor was largely above 1.2 but this decreased greatly when the Na_2SO_4 concentration was lowered further to 23 mM. The asymmetry factor values were close to 1 for all salt concentrations except for 23 mM where the peak was observed to be tailing [11]. To provide a good robustness of the method, a concentration of 37 mM Na_2SO_4 was finally chosen.

3.2. Method validation

Validation was performed concomitantly for both mobile phases, i.e., the European Pharmacopoeia mobile phase containing 148 mM sodium sulfate and the new mobile phase containing 37 mM sodium sulfate.

3.2.1. Linearity and sensitivity

LOD and LOQ values based on signal-to-noise ratio determination were 1.6 and 4.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, for both mobile phase compositions.

1
2
3 Based on the response of the UV detector, which was compliant with Beer–Lambert's law,
4 three different linear calibration curves were evaluated on three different days and for both
5 mobile phase compositions. As seen in Table 2, good linearity was achieved for each
6 calibration curve with correlation coefficients (R^2) ≥ 0.997 in the concentration range studied.

7
8
9
10
11
12 In addition, the linearity of the data was confirmed by the lack-of-fit test for which p -values
13 corresponding to Fisher's variance ratio values (p -value lof) were higher than 0.05 when
14 determined (This p -value is not calculable in the case of a one-point calibration line such as y
15 = ax).

16
17
18
19
20
21 The " $ax + b$ " regression line had a y -intercept different from 0. To evaluate the selectivity of
22 the method, b -values were statistically compared to 0. For each day and each mobile phase
23 composition, the corresponding Student's test p -values (p -value $b = 0$) were always much
24 higher than 0.05, indicating a b -value statistically not different from 0 and proving the
25 method's selectivity for the standards.

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
These results indicate that the three proposed regression lines are suitable for further insulin
quantification with both mobile phases.

3.2.2. *Trueness and selectivity*

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Trueness was evaluated using three self-prepared samples and two commercial insulin
samples (Table 3). For the same mobile phase composition and the same sample, biases did
not significantly differ according to the regression line used to determine the calculated
concentration. Bias values ranged between -3% and 8% and were therefore fully acceptable
with the 37 mM sulfate buffer mobile phase. However, high bias values (up to 14%) were
obtained for the Insuman[®] solutions with the 148 mM sulfate buffer mobile phase. This
excess could be attributed to a lack of selectivity in this mobile phase, but peak purity analysis

1
2
3 could not prove it (the upslope, apex, and downslope UV spectra were identical). Table 4
4 highlighted the biases observed between the results obtained with the different mobile phases
5 according to the sample type and showed acceptable bias values between 2 % and 6 %.
6
7
8

9 10 3.2.3. Precision

11
12 All the results concerning precision studies are summarized in Table 5. It was found that the
13 values for repeatability (RSD_r) and intermediate precision (RSD_p) were respectively lower
14 than 5 % and 8 % for all samples, independently of the calibration curve and mobile phase
15 composition used. No day-dependency was highlighted by an analysis of variance (interday
16 versus intraday variance) for any sample (data not shown).
17
18
19
20
21
22

23
24 In contrast to the trueness, the precision performance of the method was independent of the
25 type of mobile phase used.
26
27

28 29 3.3. Method application: insulin quantification in encapsulation system

30
31 The validated method was applied to the quantification of insulin for two batches of the
32 encapsulation system under two conditions (Table 6). The first condition was used to
33 determine the insulin encapsulation efficacy of the system. The second condition was used to
34 determine the stability of the encapsulated system containing insulin in intestinal medium. In
35 both cases, the amount of encapsulated insulin was determined indirectly by quantifying the
36 amount of free insulin. For these two types of characterization, insulin concentrations (14.9 to
37 35.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were in the linearity range of the method (4.5 to 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A
38 chromatogram of an SDS-NPs supernatant obtained for an encapsulation efficiency test
39 formulated with Umuline® is shown in Figure 1.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 4. Conclusion

10

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/ljlc> Email: nelugrinberg50@gmail.com

1
2
3 This study showed that a mobile phase containing 37 mM sodium sulfate constitutes in all
4 respects an improved alternative to the previously used mobile phase containing 148 mM
5 sodium sulfate, thus preserving the integrity of the chromatograph pumps and seals (no
6 system overpressures were observed while using the less concentrated mobile phase).
7
8 Furthermore, the use of a one-point calibration curve, which is less time-consuming than
9 performing a five-point calibration, was fully validated. This method could furthermore be
10 applied to the quantification of insulin encapsulation by an NP system with sufficient
11 selectivity and sensitivity.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 5. References

- 24
25
26
27 [1] Maahs, D. M.; West, N. A.; Lawrence, J. M.; Mayer-Davis, E. J. Epidemiology of type 1
28 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2010**, *39* (3), 481-497. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.05.011.
29
30 [2] Shapiro, A. M.; Pokrywczynska, M.; Ricordi, C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat.*
31 *Rev. Endocrinol.* **2017**, *13* (5), 268-277. DOI: 10.1038/nrendo.2016.178.
32
33 [3] Asmat, U.; Abad, K.; Ismail, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi*
34 *Pharm. J.* **2016**, *24* (5), 547-553. DOI: 10.1016/j.jsps.2015.03.013.
35
36 [4] Diop, M.; Auberval, N.; Viciglio, A.; Langlois, A.; Bietiger, W.; Mura, C.; Peronet, C.; Bekel, A.;
37 Julien David, D.; Zhao, M., et al. Design, characterisation, and bioefficiency of insulin-chitosan
38 nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*
39 **2015**, *491* (1-2), 402-408. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.065.
40
41 [5] Reix, N.; Parat, A.; Seyfritz, E.; Van der Werf, R.; Epure, V.; Ebel, N.; Danicher, L.; Marchioni,
42 E.; Jeandidier, N.; Pinget, M., et al. In vitro uptake evaluation in Caco-2 cells and in vivo results in
43 diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* **2012**, *437* (1-2),
44 213-220. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.08.024.
45
46 [6] Fu, Z.; Gilbert, E. R.; Liu, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-
47 cell dysfunction in diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* **2013**, *9* (1), 25-53.
48
49 [7] Hoier, R.; Jensen, A. L. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for
50 determination of insulin in dogs. *Zentralbl. Veterinaermed., Reihe A* **1993**, *40* (1), 26-32.
51
52 [8] Lassalle, V.L.; Pirillo S., Rueda E., Ferreira M.L. An accurate UV/visible method to quantify
53 proteins and enzymes: Impact of aggregation, buffer concentration and the nature of the standard.
54 *Curr. Top. Anal. Chem.* **2011**, *8*, 83-93.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [9] Chen, Z.; Caulfield, M. P.; McPhaul, M. J.; Reitz, R. E.; Taylor, S. W.; Clarke, N. J. Quantitative
4 insulin analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a high-throughput clinical
5 laboratory. *Clin. Chem. (N. Y.)* **2013**, *59* (9), 1349-1356. DOI: 10.1373/clinchem.2012.199794.
6
7 [10] European Pharmacopoeia 8.0, 0838, Insulin, Human. **2014**.
8
9 [11] European Pharmacopoeia 8.0, 20246, Chromatographic separation techniques. **2008**.
10
11 [12] ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **2005**.
12
13 [13] Araujo, P.; Janagap, S.; Holen, E. Application of Doehlert uniform shell designs for selecting
14 optimal amounts of internal standards in the analysis of prostaglandins and leukotrienes by liquid
15 chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1260*, 102-110. DOI:
16 10.1016/j.chroma.2012.08.056.
17
18 [14] Czuba, E.; Diop, M.; Mura, C.; Schaschkow, A.; Langlois, A.; Bietiger, W.; Neidl, R.; Virgilio, A.;
19 Auberval, N.; Julien-David, D., et al. Oral insulin delivery, the challenge to increase insulin
20 bioavailability: Influence of surface charge in nanoparticle system. *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)*
21 **2018**, *542* (1-2), 47-55. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.045.
22
23
24

TABLES

Na ₂ SO ₄ concentration (mM)	Resolution (R _s)	Peak asymmetry factor (A _s)
148	1.51	1.075
74	1.53	1.105
37	1.43	1.075
23	1.22	1.750

37
38
39 Table 1: Resolution between porcine and human insulins at 2 mg.mL⁻¹ and human insulin
40 peak asymmetry factor for different mobile phase sodium sulfate concentrations.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Sodium sulfate concentration	148 mM			37 mM		
day	a	b	c	d	e	f
$ax + b$						
equation	$y=114803x + 108652$	$y=105296x - 285135$	$y=106040x + 151600$	$y=119183x - 12000$	$y=116310x - 128947$	$y=103553x + 253252$
R ²	0.9987	0.9994	0.9993	0.9968	0.9983	0.9991
p-value b=0	0.76	0.23	0.53	0.98	0.76	0.35
p-value lof	0.25	0.66	0.06	0.16	0.94	0.06
$ax + \theta$						
equation	$y=115053x$	$y=104639x$	$y=106390x$	$y=119156x$	$y=116012x$	$y=104136x$
R ²	0.9994	0.9996	0.9996	0.9984	0.9991	0.9995
p-value b=0	-	-	-	-	-	-
p-value lof	0.36	0.57	0.09	0.25	0.97	0.07
ax						
equation	$y=114244x$	$y=105114x$	$y=105663x$	$y=120353x$	$y=115800x$	$y=103257x$
R ²	0.9995	0.9998	0.9998	0.9997	0.999	0.9999
p-value b=0	-	-	-	-	-	-
p-value lof	-	-	-	-	-	-

Table 2: Validation data for method linearity. a, b, c, d, e, f are six different days. p-values are obtained for Student's (testing nullity of b) or Fisher's (testing lack-of-fit [lof] of the regression line) tests.

Sodium sulfate concentration	148 mM					37 mM					
sample	30	80	400	120	480	sample	30	80	400	120	480
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Umuline®					Insuman®					
$ax + b$											
mean	29.3	80.8	387.2	127.0	540.1	mean	29.2	80.5	400.2	119.4	511.7
bias %	-2.43	1.02	-3.19	6.74	13.46	bias %	-2.62	0.57	0.04	0.37	7.50
$ax + \theta$											
mean	29.2	80.7	387.2	126.9	540.1	mean	29.6	80.8	400.2	119.7	511.6
bias %	-2.77	0.90	-3.19	6.67	13.47	bias %	-1.36	0.99	0.05	0.61	7.49
ax											
mean	29.3	81.0	388.4	127.3	541.8	mean	29.6	80.8	400.2	119.8	511.8
bias %	-2.47	1.23	-2.89	7.01	13.82	bias %	-1.34	1.00	0.06	0.64	7.51

Table 3: Validation data for method trueness.

Sample	$ax + b$	$ax + 0$	ax
30	-0.20	1.45	1.16
80	-0.45	0.09	-0.23
400	3.33	3.34	3.04
Umuline®	-5.96	-5.68	-5.95
Insuman®	-5.25	-5.27	-5.54

Table 4: Bias (%) between results obtained with mobile phases containing 37 mM and 148 mM sodium sulfate.

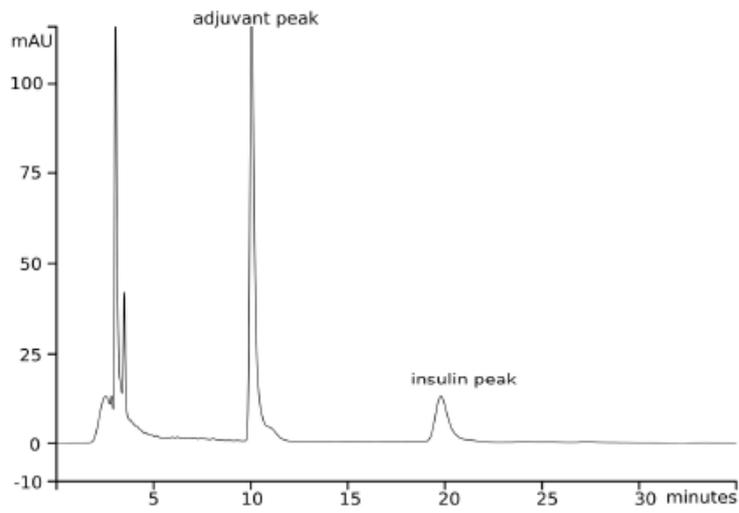
Sodium sulfate concentration		148 mM					37 mM						
sample	$\mu\text{g mL}^{-1}$	30	80	400	120	480	sample	$\mu\text{g mL}^{-1}$	30	80	400	120	480
		Umuline®					Umuline®						
		Insuman®					Insuman®						
$ax + b$													
mean	$\mu\text{g mL}^{-1}$	29.3	80.8	387.2	127.0	540.1	mean	$\mu\text{g mL}^{-1}$	29.2	80.5	400.2	119.4	511.7
RSD _r		2.05	4.06	1.98	3.93	1.91	RSD _r		1.97	1.74	1.57	3.42	2.26
RSD _p		7.51	4.06	7.76	3.93	4.87	RSD _p		3.07	1.75	1.57	5.37	2.87
$ax + 0$													
mean	$\mu\text{g mL}^{-1}$	29.2	80.7	387.2	126.9	540.1	mean	$\mu\text{g mL}^{-1}$	29.6	80.8	400.2	119.7	511.6
RSD _r		2.05	4.05	1.97	3.92	1.91	RSD _r		1.94	1.73	1.57	3.41	2.25
RSD _p		2.42	4.64	7.74	3.92	4.85	RSD _p		6.49	2.12	1.57	6.31	2.84
ax													
mean	$\mu\text{g mL}^{-1}$	29.3	81.0	388.4	127.3	541.8	mean	$\mu\text{g mL}^{-1}$	29.6	80.8	400.2	119.8	511.8
RSD _r		2.06	4.07	1.98	3.93	1.91	RSD _r		1.94	1.72	1.57	3.38	2.26
RSD _p		2.48	5.11	7.71	3.93	4.90	RSD _p		6.75	2.33	1.57	6.92	3.59

Table 5: Validation data for method precision (measurements on three separate days with three determinations per day, relative standard deviation [RSD] in %).

Type of encapsulation	Encapsulation efficiency		Intestinal conditions	
	Insulin concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Encapsulation efficiency (%)	Insulin concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Stability of system in intestinal medium (%)
	αx			
SDS-NPs	19.9 ± 4.2	85.8 ± 3.0	15.6 ± 1.7	75.5 ± 2.5
SDS-chitosan NPs	14.2 ± 9.0	92.9 ± 4.5	14.9 ± 6.8	65.1 ± 8.3

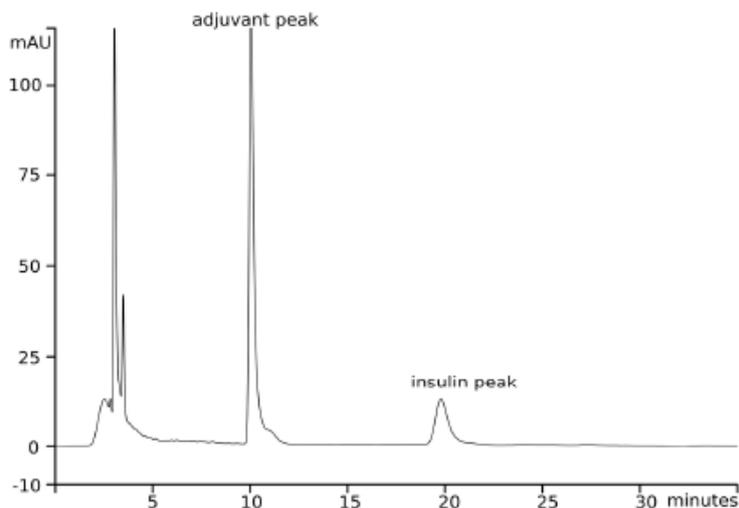
Table 6: Insulin quantification using the validated method to determine the encapsulation efficiency and encapsulated system stability in simulated conditions for two different encapsulation systems ($n = 3$).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



541x399mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Chromatogram obtained for the quantification of insulin in the supernatant to determine the encapsulation efficiency (SDS-NPs with Umuline®).

541x399mm (96 x 96 DPI)

EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION

REQUEST FOR REVISION OF A MONOGRAPH OR GENERAL CHAPTER

Presented by:	Date:	
Concerning:	Monograph No:	Chapter No.
Title/Name:		

URGENT <input type="checkbox"/>	NOT URGENT <input type="checkbox"/>
REASON FOR REVISION:	
<input type="checkbox"/> Error in text	
<input type="checkbox"/> Quality defined by the monograph no longer available	
<input type="checkbox"/> New source on the market	
<input type="checkbox"/> Impurity not covered by the monograph: Name:	
<input type="checkbox"/> qualified	<input type="checkbox"/> others
<input type="checkbox"/> Analytical improvement	
<input type="checkbox"/> Reagents/equipment no longer available	
Name:	Test:
<input type="checkbox"/> Other (specify):	

FOR EDQM ONLY:
<input type="checkbox"/> Laboratory: PA/PH report:
<input type="checkbox"/> DBO: please specify (e.g. BSP, CAP, etc...):
Copy of supporting document (study or meeting report, OMCL testing report, etc...) must accompany the request.
<input type="checkbox"/> Other:
Please describe the issue/ suggestion:

D



***Valorisation des compétences, NCT® 2018
Un Nouveau chapitre de la thèse***

Elodie Czuba

Ecole doctorale : science de la vie et de la santé

Laboratoire de recherche et/ou unité de recherche : centre Européen d'étude du diabète/DIATECH EA 7294

Université : Strasbourg

Les bio-médicaments : de la voie injectable à la voie orale

Intitulé académique de la thèse : Développement de nouveaux systèmes nanoparticulaires pour l'administration de bio-médicaments par voie orale

Nom des directeurs de thèse : Séverine Sigrist, Eric Marchioni

Date de soutenance de thèse : 28 septembre 2018

1. Cadre général et enjeux de votre thèse

1.1. Présentation succincte

L'adhésion thérapeutique à un traitement est aujourd'hui un enjeu économique et sociétal majeur dans la prise en charge du patient. En effet, à l'échelle mondiale, on estime que les coûts évitables liés au manque d'adhésion thérapeutique dépassent les 470 milliards de dollars, soit environ 8% des dépenses de santé annuelles. En ce qui concerne le taux d'adhésion, celui-ci peut varier de 20 à 90% selon les études.

Les causes sont multiples : l'oubli, le manque d'information mais également l'impact réel du traitement sur la vie quotidienne (douleur, effets secondaires, manque d'autonomie, coût). C'est pourquoi, une des solutions pour palier à ce manque d'adhésion est le changement de voie d'administration de principe actif. En effet, de nombreuses études ont montré que le traitement lui-même pouvait avoir un réel impact sur l'adhésion thérapeutique.

Nous nous sommes donc intéressés à différents principes actifs à administration quotidiennes : c'est le cas de l'insuline dans le traitement du diabète ou encore de l'héparine dans le traitement préventif de thrombose veine profonde ou d'embolie pulmonaire. Ces principes actifs étant aujourd'hui administrés par voie parentérale posent de sérieux soucis d'adhésion pour le patient.

L'idée dans le cadre d'une collaboration était donc de développer un système d'encapsulation permettant une administration de ces principes actifs par voie orale. Ce système a dans un premier temps été développé pour l'insuline mais n'a pas montré l'efficacité attendue.

Mon travail a donc consisté dans un premier temps à travailler sur l'amélioration du système d'encapsulation pour une administration orale d'insuline et dans un second temps de transposer ce système à un autre bio-médicament qu'est l'héparine.

1.2. Ma thèse dans son contexte

Cette thèse réalisée au Centre Européen d'Etude du Diabète entre donc dans le cadre d'un projet débuté il y a 15 ans sur l'encapsulation d'insuline pour une administration par voie orale qui à ce jour a fait l'objet de 5 thèses. Ma thèse fait donc aujourd'hui partie intégrante du

projet puisqu'il est dans la continuité des précédents travaux réalisés. Elle constitue même à elle seule le projet à ce jour.

De plus, cette thèse s'inscrit dans un contexte plutôt particulier « de transition ». En effet, un projet de montage d'une spin-off est en cours sur ce projet afin d'élargir les capacités du système d'encapsulation développé ayant fait l'objet d'un dépôt de brevet.

En parallèle de cette thèse et dans le cadre du projet de « spin-off », j'ai pour mission l'encadrement d'une étudiante en master ayant pour rôle de screener différents principes actifs afin de définir les limites du système d'encapsulation.

1.3. Partenariats et concurrence

L'intérêt de ce projet est qu'il fait appel à de nombreuses compétences se situant à l'interface de la chimie et de la biologie et faisant donc intervenir à la fois des chimistes et des biologistes issus du domaine privé (CEED), du domaine public (CNRS, université) ainsi qu'un partenaire industriel nous permettant de tester notre procédé de formulation à une échelle pilote ce qui fait intervenir la notion de propriété intellectuelle ayant un partenariat entre 5 structures et un brevet en jeu.

Dans le domaine de l'encapsulation d'insuline, la concurrence est rude au vu du marché prometteur du diabète à travers le monde. En effet, de nombreuses entreprises pharmaceutiques sont en phases d'essais cliniques même si à l'heure actuelle aucun acteur n'a passé la phase 3 principalement due à une toxicité ou à une faible biodisponibilité qui empêcherait la rentabilité.

1.4. Mes motivations pour la thèse

Ma principale motivation à préparer un doctorat est la qualification du poste auquel je prétends après la thèse. En effet, je souhaiterais m'orienter dans la gestion de projet R&D alliant une fonction managériale ou le doctorat est souvent requis.

De plus, ce sujet de thèse m'a tout de suite plu par son caractère multidisciplinaire, à l'interface de la chimie et de la biologie correspondant parfaitement à ma formation universitaire (master chimie-biologie). Cette interface permet d'allier formulation (chimie), validation *in vitro* et manipulations sur le petit animal (biologie).

1.5. Mon investissement dans la thèse

Je n'ai pas été à l'origine de la programmation du projet étant un projet de longue date et ayant repris la fin d'une thèse en cours à l'époque où j'ai commencé, en 2015. Par contre, j'ai participé à l'évolution qu'on a voulu donner ainsi qu'au choix du second principe actif étudié.

2. Déroulement, gestion et coût estimé de mon projet

Dans un projet de recherche tel qu'une thèse, l'aspect management semble être un pilier à prendre en compte dans la balance succès/risques. Cet aspect a pour moi été un réel challenge aussi bien dans la relation avec ma directrice de thèse qu'avec les étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer pendant ces 3 années.

2.1. Déroulement et gestion de la thèse

En effet, dans les premiers temps un rythme de travail était imposé car mis en place avant mon arrivée sur le projet, cadré par une réunion hebdomadaire avec ma directrice de thèse afin de faire un point sur les avancements du projet mais également avec un comité de pilotage. Celui-ci se déroulait tous les 6 mois avec tous les partenaires associés au projet aussi bien les industriels que les différents laboratoires travaillant sur le projet ce qui nous permettait à chacun de présenter l'avancement des travaux. Mais après quelques mois le projet financé pour 5 ans est arrivé à son terme et le choix a donc été de ne pas continuer avec nos différents partenaires dans l'idée de créer la spin-off.

C'est à ce moment-là que l'aspect propriété intellectuelle entre en jeu. En effet, la négociation afin que chaque partenaire nous laisse sa part du butin n'a pas été simple et montre tout l'enjeu à ce niveau d'un tel projet entre 6 partenaires dont des structures privées et publiques. De plus, un brevet a été déposé au départ du projet en collaboration avec le CNRS.

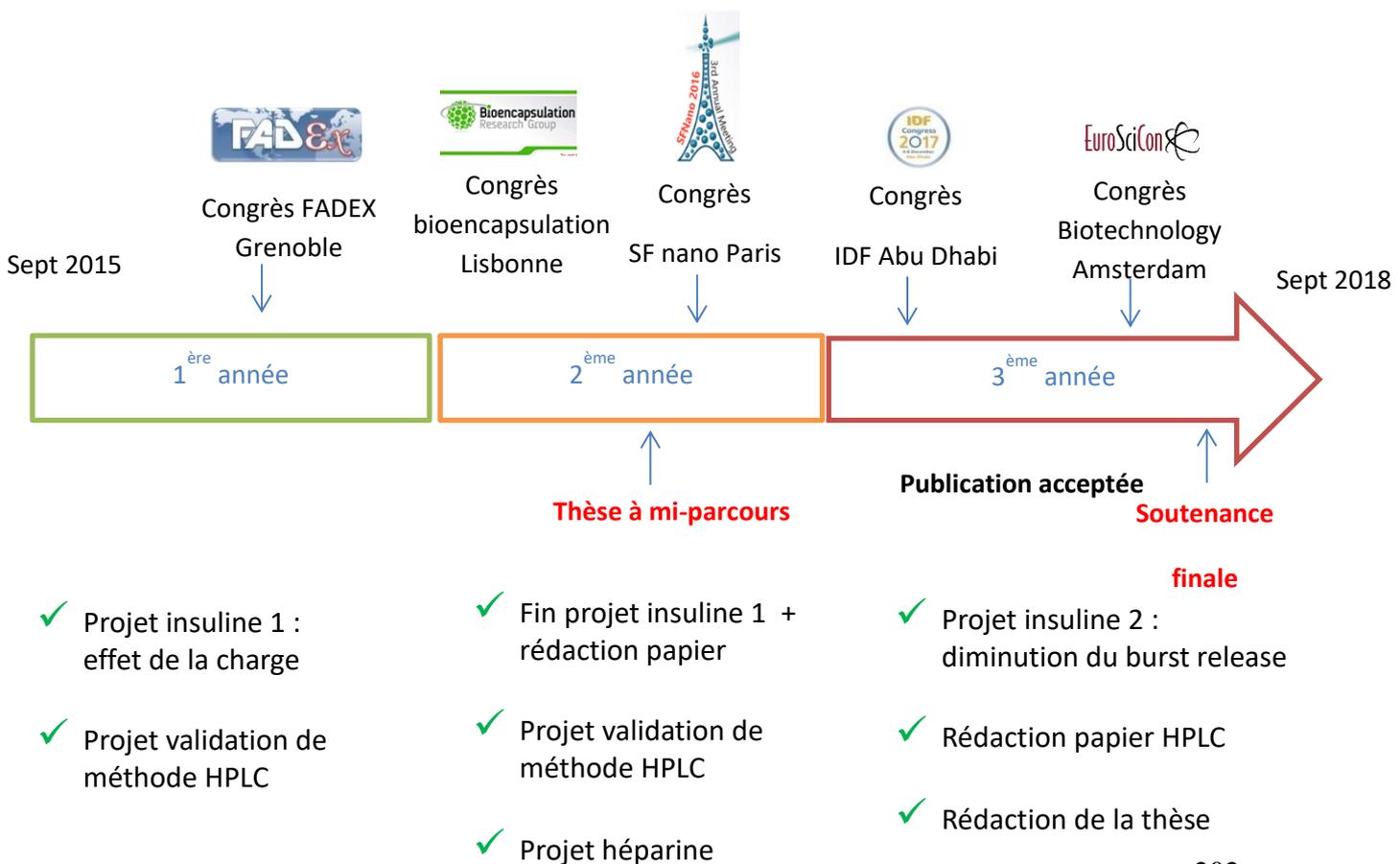
L'idée de la création d'une spin-off durant mes 3 années de thèse a été un réel chamboulement dans la gestion du projet sur l'aspect organisationnel et la création d'une nouvelle équipe.

2.2. SWOT de la thèse :

<u>Forces</u>	<u>Faiblesses</u>
Budget Interface chimie/biologie Partenariat publique/privée, industriel Propriété intellectuelle : brevet	Statut de l'entreprise (peu de demande de financement possible) Manque d'expertise
<u>Opportunités</u>	<u>Menaces</u>
Partenariat ? Création start-up	Concurrence sévère sur l'insuline orale Manque de personnel/équipe/encadrement

D'un point de vue financier, la création de la spin-off a pour vocation de créer un statut d'entreprise autour de ce projet afin de pouvoir faire plus de demandes de financements mais également permettre l'apport d'une expertise dans le domaine de l'encapsulation qui sont les principales faiblesse du projet.

2.3. Principales étapes du déroulement de la thèse :



2.4. Coût de la thèse

Nature de la dépense	Détails			Coûts totaux (euros TTC)		
	Salaire brut	Charges	Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
Ressources Humaines						
Doctorant	1839	697	36		100	91296,00
Encadrant 1			36		20	8 254,00
Encadrant 2			36		10	4127,00
Autre personnel (hors sous-traitance)					10	4 466,28
Master	850	500	12		10	1 620,00
DUT			2		100	1 200,00
Sous-total Ressources Humaines						110963,28
Consommables						
Fournitures expérimentales du projet					100	77 935,00
Infrastructures						702,00
Electricité, chauffage, eau						2 400,00
Loyer						4 800,00
Sous-total infrastructures						7 902,00
Déplacements						
Missions en France			1	58	100	58,00
Congrès			5	991,8	100	4 959,13
Sous-total Déplacements			6	1049,8	100	5 017,13
Formation						
Formations	Expérimentation animale niveau I				100	5 645,00
Autres frais (inscription Université, sécurité sociale,,)			3	420		1260,00
Sous-total Formations			3	420	100	6 905,00
Documentation et communication						
Publicité, communication, impressions						80,00
Sous-total Documentation et communication						80,00
Total						208882,41

Coût total de la thèse environ **210000 euros** dont plus de la moitié en ressource humaines et environ 40% de fournitures expérimentales.

Cette thèse a été financée sur les fonds propres du CEED ce qui m'a permis de pouvoir me focaliser sur mes travaux de recherche malgré quelques demandes de bourse (l'Oréal, FMR)

qui m'ont permises de me sensibiliser au plus près à cet aspect et avoir un œil global sur le temps que prend une demande de financement et le coût d'un projet de recherche.

3. Compétences, savoir faire, qualités professionnelles et personnelles

3.1. Bilan de mes compétences

Mon cœur de métier est défini dans le domaine de la recherche scientifique et plus particulièrement la recherche sur un projet à l'interface de la chimie et de la biologie avec une dominante encapsulation de principes actifs à visée thérapeutique.

Plus en détails, j'ai classifié mes compétences acquises dans le domaine :

Compétences scientifiques	Techniques	Management de la science
– Statistique	– Expérimentation animale	– Planification et management de projet
– Toxicologie	– Chirurgie animale	– Recherche et gestion bibliographique
– Expérimentation animale	– HPLC	– Veille scientifique et brevet
– Chirurgie animale	– Validation de méthode analytique	– Management (stagiaires, techniciens)
– Pharmacie galénique	– Validation <i>In vitro</i>	– Communication orale et écrite
– Biologie cellulaire	– Validation <i>In vivo</i>	– Interaction avec mon équipe/d'autres
– Biologie animale	– Validation <i>Ex vivo</i>	
– Rédaction de rapport scientifique	– Synthèse de NPs	
	– Caractérisation de NPs	
	– Modification de la surface des NPs	

Piliers de compétence	<u>Cœur de métier</u>	<u>Qualités personnelles et relationnelles</u>	<u>Gestion de l'activité et création de valeur</u>	<u>Stratégie et leadership</u>
<u>Acquises</u>	Connaissances des techniques dans mon domaine	Analyse et esprit critique	Conduite de projet : reconnaissance du travail des autres,	Leadership dans un projet
	Connaissances de base, concepts	Hiérarchisation des objectifs	rédaction d'un cahier des charges, planification	
	Veille scientifique	Esprit de synthèse	Prise de décision	Relations de confiance
	Adaptation de l'argumentaire	Remise en cause	Notion de management personnalisé (reconnaissance)	
	Etat de l'art	Assurance/contestation		
<u>A améliorer</u>	Statistiques	Ecoute, considération/empathie	Adaptation aux changements	Stratégie : identification de soutiens, stratégie d'organisation dans le secteur d'activité
	Langues, contexte international	Expérience à l'internationale	Gestion des ressources financières	
	Structuration de l'argumentaire	Choix vie privée/vie professionnelle	Audit	
	Auto-évaluation	Négociation (techniques, besoins, enjeux)	Créer et entretenir des collaborations	Convaincre
		Réseau professionnel		

3.2. Compétences à mettre en valeur

Les qualités personnelles que je souhaite mettre en avant **sont l'écoute, l'empathie et la considération** qui pour moi sont des qualités indispensables pour le bon vivre en entreprise d'une part et d'autre part en tant que futur manager d'équipe.

En effet, je souhaite réellement développer ces compétences personnelles et qui me semblent être les clés de la réussite de mon projet professionnel en tant que manager R&D. Cela rejoint la deuxième compétence que je souhaiterais mettre en avant qui est la notion de management participatif.

Ce **management participatif** est basé sur un réel échange entre l'encadrant et l'équipe où la vision du supérieur hiérarchique qui décide tout n'existe plus. Cela passe par la mise en place de réunions de travail dites « brainstorming » où chaque personne de l'équipe participe et prends la parole. Mais également des réunions dites « d'amélioration constante » où les membres de l'équipe de façon régulière font un retour sur l'encadrement mis en place ainsi que les points à améliorer. Cet échange doit également se faire dans les deux sens où un bilan régulier des compétences personnelles de chaque personne et les points à améliorer sont abordées. Enfin, un accent doit également être mis sur la reconnaissance du travail par les managers. En effet, je trouve de par mon expérience que le management auquel j'ai été confrontée n'ont pas ou peu de reconnaissance pour leurs employés ce qui peut être source de démotivation.

A mon échelle, la mise en place de ce type de management avec les personnes en stage ou apprenties que j'ai encadrées a été très enrichissante et m'a permis de m'améliorer au fur et à mesure.

Enfin du point de vu de l'activité, **la conduite de projet** est pour moi un aspect que je souhaite mettre en valeur de par la gestion de mon projet de thèse de façon très autonome ayant une directrice de thèse sur plusieurs fronts. J'ai ainsi acquis une très forte autonomie que je souhaite mettre en valeurs que ce soit sur l'aspect **planification**, mise en **place d'un cahier des charges** et **communication du travail fourni** par l'organisation et l'animation de réunions mensuelles.

En effet, j'ai appris à planifier mon temps mais également celui des stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer avec une organisation où les plannings étaient réalisés à la semaine ce qui permettait une certaine autonomie pendant la semaine.

4. Résultats et impact de ma thèse

Cette thèse effectuée au CEED pourrait avoir un impact sur la suite donnée au projet. En effet la création d'une start-up devrait être un nouveau tremplin pour la future administration orale d'insuline qui pourrait réellement changer la vie des patients diabétiques. En effet,

l'administration orale d'insuline permettrait de supprimer la douleur des injections mais également de réduire les effets indésirables comme les hyperglycémies sévères.

De plus, d'un point de vue financier, un service de prestation de service pourrait être mis en place au sein de la nouvelle entreprise afin de pouvoir financer la recherche qui avec ces moyens pourrait être plus intensive qu'à l'heure actuelle sur le projet.

D'un point de vue personnel, cette thèse m'a énormément apporté. Humainement d'abord, par les rencontres exceptionnelles que j'ai pu faire. Je sais qu'il sera difficile de m'intégrer à une autre structure de par mon attachement à celle-ci mais cette étape reste indispensable pour mon évolution personnelle et professionnelle.

Le CEED c'est également un esprit d'équipe, moins présent les dernières années mais ce revirement de situation m'a permis de savoir dans quel dynamique de travail je m'épanouie. Le « tous ensembles » et une bonne ambiance de travail reste pour moi la clé d'une bonne entreprise.

Professionnellement, ces trois années de thèse m'ont permises de savoir que la recherche est avant tout une passion mais que celle-ci doit s'exercer au contact du patient. Le CEED est une association où bénévoles et patient sont présents au quotidien et où l'intérêt de notre recherche prend tout son sens. Je souhaiterais réellement revenir travailler dans ce type de structure dans l'avenir.

5. Projets professionnels

Mes exigences

- Hiérarchie : peu d'intermédiaires
- Peu de manipulations techniques
- Reconnaissance salariale : 35K€/an minimum

5.1. Premier poste dans l'industrie pharmaceutique

Après une consultation régulière des postes que j'aimerais pourvoir, 3 à 5 ans d'expérience dans l'industrie pharmaceutique sont demandés. L'idée serait donc de trouver un premier poste en industrie soit par un post-doctorat dans l'industrie ou bien avec un poste axé R&D afin par la suite de trouver un poste de manager en interne ou dans une autre entreprise avec cette expérience en plus.

Après avoir consulté les offres dans les entreprises du type industrie pharmaceutique, un poste de chef de projet ou même chargé de recherche pourrait réellement me correspondre. Ce type de poste reste assez multidisciplinaire avec une partie veille scientifique, une partie pilote des partenaires, une partie plus technique et une partie plus rédactionnelle. L'expérience demandée par ce type d'offre peut se justifier par mes années passées en laboratoire durant ma thèse puisqu'elle s'adresse à des profils plutôt juniors.

5.2. Départ à l'étranger

Ayant déjà eu une expérience de recherche d'emploi durant une année, je souhaiterais cette fois-ci mettre à profit ce temps pour améliorer mon niveau d'anglais. Pour cela, je souhaiterais partir à l'étranger quelques mois afin d'améliorer ce niveau et pourquoi pas y trouver un emploi dans mon domaine si la destination me plaît.

5.3. Manager R&D

J'ai eu la chance de pouvoir m'entretenir avec Mr Magisson qui m'a éclairci sur son poste occupé au sein de la start-up DEFYMED. Son poste correspond tout à fait au type de poste que je souhaiterais occuper par la suite avec une multidisciplinarité intéressante.

Son quotidien rimant avec 50% de manipulations dites « techniques » et 50% de travail dit « administratif ».

D'après lui, les atouts d'un tel type de poste sont les nombreuses collaborations avec d'autres structures où du reporting en interne est fait régulièrement. Mais également la hiérarchie de par les responsabilités du poste où il faut manager l'équipe technique en ayant qu'une seule personne au dessus de lui de part la taille de l'entreprise. Il n'y a donc pas d'intermédiaires. Enfin la multidisciplinarité et donc la non redondance des tâches.

Les inconvénients sont la conciliation des nombreuses tâches à effectuer : manager l'équipe technique, formation, manipulations, gestion des plannings, maintenance, veille scientifique ce qui peut parfois induire un stress.

En revanche, les qualités requises sont l'organisation, savoir aller à l'essentiel et être productif.

5.4. Plan d'action

Date- période	Tâches
Mai/juin	Modifications CV + CV en anglais
Juin/juillet	Liste des entreprises intéressantes avec leur contact
Août-décembre	Recherche active
Janvier	Préparation d'un départ à l'étranger

Développement de systèmes nanoparticulaires pour l'administration orale de bio-médicaments

Résumé

Les bio-médicaments sont aujourd'hui confrontés à un manque d'adhésion thérapeutique due principalement à leur voie d'administration parentérale. Pour pallier à cela, un système de double encapsulation composé d'une gélule gastro-résistante renfermant un système de nanoparticules (NPs) polymériques à base de PLGA a été développé apportant protection et absorption pour *in fine* une administration par voie orale.

L'objectif de ce travail a été de mettre au point le système de NPs renfermant de l'insuline, en jouant sur la charge de surface afin d'augmenter la biodisponibilité. Ainsi, nous avons montré un meilleur passage intestinal des nanoparticules grâce à l'apport d'une charge de surface négative confirmé par une diminution de la glycémie *in vivo*. Ensuite les NPs ont été recouvertes d'acide hyaluronique afin de réduire la perte intestinale d'insuline.

Une fois validé avec l'insuline, le système nanoparticulaire a été transposé à un second bio-médicament d'intérêt, l'héparine. Ainsi, nous avons obtenu des paramètres physico-chimiques semblables à ceux obtenus avec l'insuline prouvant le transfert de notre technologie.

Mots clés : nanoparticules, bio-médicaments, voie orale

Résumé en anglais

Biologics are administrated by parenteral route due to their degradation in the gastrointestinal tract. This administration mode leads to low adherence, showed by the low adherence for chronic diseases treatment. In order to increase adherence by reducing pain and adverse effects associated with treatment we developed a double encapsulation system to protect and increase biologic absorption for a future oral administration. Our system consists in encapsulated biologics inside PLGA-nanoparticles (NPs), themselves encapsulated inside a gastroresistant vehicle. The aim of this work was to improve the system efficiency with insulin by NPs charges modification and intestinal release reduction and to transfer the technology to another molecule: the heparin. Negative charges improved the intestinal nanoparticle crossing as shown by the insulinopenic rat model with a decrease of glycaemia. To stabilize the NPs system in intestinal medium, a hyaluronic acid coating was tested and validated *in vitro*. When transferred to another biologics, we showed similar NPs characteristics with heparin than with insulin, revealing the transposition of our technic.

Mots clés : nanoparticles, biologics, oral administration